

**SYNTHESE UND UNTERSUCHUNGEN
ZUR WIRKUNG MAMMATUMORHEMMENDER
N,N'-DIALKYL-1,2-DIPHENYLÄTHYLENDIAMINE**

Günter Egginger

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

SYNTHESE UND UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG
MAMMATUMORHEMMENDER
N,N'-DIALKYL-1,2-DIPHENYLÄTHYLENDIAMINE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Günter Egginger
aus
Regensburg



1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Schönenberger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Eiden

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 1978

Das obige genannte Institut wurde am 1. Januar 1970 für die Zwecke der
Landesentwicklung im Bereich der Landesentwicklung gegründet.

Die Aufgaben des Instituts werden bestimmt durch das Gesetz vom
1. 1. 1970, das die Aufgaben des Landesentwicklungsinstituts
bestimmt und die Aufgaben des Landesentwicklungsinstituts
bestimmt.

Das Institut ist ein Institut der Landesentwicklung, das die
Aufgaben des Landesentwicklungsinstituts bestimme und die Aufgaben
des Landesentwicklungsinstituts bestimme und die Aufgaben
des Landesentwicklungsinstituts bestimme.

Das Institut ist ein Institut der Landesentwicklung, das die
Aufgaben des Landesentwicklungsinstituts bestimme und die Aufgaben
des Landesentwicklungsinstituts bestimme und die Aufgaben
des Landesentwicklungsinstituts bestimme.

FÜR RENATE

Das Institut ist ein Institut der Landesentwicklung, das die
Aufgaben des Landesentwicklungsinstituts bestimme und die Aufgaben
des Landesentwicklungsinstituts bestimme und die Aufgaben
des Landesentwicklungsinstituts bestimme.

Das Institut ist ein Institut der Landesentwicklung, das die
Aufgaben des Landesentwicklungsinstituts bestimme und die Aufgaben
des Landesentwicklungsinstituts bestimme und die Aufgaben
des Landesentwicklungsinstituts bestimme.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München durchgeführt.

Die Anregung zu dieser Arbeit erhielt ich von Herrn Prof. Dr. H. Schönenberger, dem ich für die wissenschaftliche Anleitung und Betreuung zu großem Dank verpflichtet bin.

Herrn Prof. Dr. F. Eiden und Herrn Prof. Dr. H. D. Stachel, Vorstände des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, danke ich für das mir entgegengebrachte persönliche Interesse und Wohlwollen.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. M. Kiese, Vorstand des Pharmakologischen Instituts der Universität München, für die freundliche Aufnahme im Institut und die Förderung meiner pharmakologischen Untersuchungen.

Ferner danke ich auch Herrn Prof. Dr. H. Wagner und Dr. habil. J. Hölzl, in deren Isotopenlabor ich die Szintillationsmessungen durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. W. Wuttke, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie - Göttingen, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Erarbeitung des Radioimmunoassays für Ratten-Prolaktin.

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung	1
B.	Chemie der N,N-Dialkyl-1,2-diphenyl- äthylendiamine	2
1.	Herstellung von N,N'-Dialkyl-1,2- diphenyl-äthylendiaminen	2
1.1.	Syntheseverfahren I und II	2
1.2.	Trennung der Diastereomerengemische	9
1.2.1.	durch Kristallisation	9
1.2.2.	durch multiplikative Verteilung	10
1.3.	Vergleichende Betrachtung der Synthese- verfahren I und II	18
1.4.	Herstellung von N,N'-Dialkyl-1,2-di- (hydroxy- und chlorhydroxyphenyl)- äthylendiaminen durch Spaltung ihrer Methyl- und Benzyläther	20
1.4.1.	Angewandte Methoden	20
1.4.1.1.	Spaltung der Methyläther	20
1.4.1.2.	Spaltung der Benzyläther	21
1.5.	Konfigurative Zuordnung der Diastereomeren	21
1.5.1.	H^1 NMR-Spektroskopie	21
1.5.2.	Verteilungsverhalten	22
1.5.3.	D.C.	22
1.5.4.	Schmelzpunkt	22
1.5.5.	Ergebnisse	22

2.	(+)- und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin	24
2.1	Versuche zur Auftrennung des Racemats	24
2.2	Synthese aus (+)- und (-)-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin	25
2.2.1	Ausgangsverbindung	28
2.2.2.	Meso-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylen-diamin durch Diaza-Cope-Umlagerung	29
2.2.3.	Meso-dl-Stereoisomerisierung von 1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiaminen	30
2.2.4.	Auftrennung von racem-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin in dessen optische Antipoden	32
2.2.5.	Herstellung von (+)- und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylen-diamin	32
2.2.5.1.	Versuche zur Herstellung durch Reduktion der doppelten Schiffischen Basen	32
2.2.5.2.	Darstellung von N,N'-Dibutryl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin	33
2.2.5.3.	(+)- und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin	33
C.	Pharmakologische Prüfung	35
1.	Testsystem zur Auffindung mammatumormemmender Oestrogen-Rezeptor-affiner Substanzen	35
1.1.	Hemmung der ³ H-Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung	36
1.2.	Testung auf östrogene Eigenschaften - kolpotrope und uterotrope Wirkung -	36

III

1.3.	Testung auf antiöstrogene Eigenschaften - antiuterotrope Wirkung -	38
1.4.	Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor- Bindung	38
1.5.	DMBA-induzierter hormonabhängiger Mamma- tumor	39
1.6.	Walker-256-Carcinosarkom - cytocide Wirkung -	39
1.7.	Beeinflussung des Serum-Prolaktinspiegels	40
2.	Versuchsergebnisse	42
2.1.	Entwicklung Oestrogen-Rezeptor-affiner Verbindungen aus Hexöstro: N-isostere Hexöstrole vom Typ der N,N'-Dialkyl-1,2- diphenyläthylendiamine	42
2.1.1.	Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_1) des Inhibitor- E_2 -Rezeptor-Komplexes	42
2.1.2.	Bestimmung der östrogenen Eigenschaften, - uterotrope und kolpotrope Wirkung -	58
2.1.3.	Bestimmung der antiöstrogenen Eigen- schaften, - antiuterotrope Wirkung -	60
2.1.4.	Bestimmung der Reversibilität der E_2 -Re- zeptorbindung	63
2.1.5.	Hemmung des DMBA-induzierten hormonab- hängigen Mammatumors der SD-Ratte	67
2.1.6.	Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinbio- synthese des Walker-256-Carcinosarkoms sowie Bestimmung der cytociden Wirkung	77
2.1.7.	Beeinflussung des Serum-Prolaktinspiegels durch racem- und meso-N,N'-Dibutyl-1,2- di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin	77
2.1.8.	Beeinflussung des Serum-Östradiol-Spiegels	80

2.1.9.	Beeinflussung von p-Nitrophenylphosphatase bzw. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in DMBA induzierten Mammatumoren	80
3.	Diskussion	82
3.1.	Allgemeines	82
3.2.	Einfluß verschiedener Substituenten auf die Affinität zum Oestradiol-Rezeptor (Ringsubstituenten, N-Alkylkettenlänge, Konfiguration-Diastereomere, Antipoden-, Imidazolidine)	82
3.3.	Uterotrope - antiuterotrope Wirkung, Reversibilität der Oestradiol-Rezeptor- Wechselbeziehung	87
3.4.	Zur Wirkung am DMBA-induzierten Mamma- carcinom der Ratte	87
3.4.1.	Direkter Angriff am Tumor	89
3.4.2.	Angriff auf hypophysär-hypothalamischer Ebene	91
3.5.	Abschließende Betrachtungen	94
D.	Experimenteller Teil	95
1.	Allgemeine Synthesevorschriften	95
1.1.	Verfahren zur Herstellung von t-Butyl- hypochlorit	95
1.2.	Verfahren zur Herstellung von chlorierten Methoxy- und Hydroxybenzaldehyden	95
1.3.	Verfahren zur Herstellung von Benzyliden- alkylaminen	96
1.4.	Verfahren I zur Herstellung von N,N'-Di- alkyl-1,2-diphenyläthylendiaminen	96

1.5.	Verfahren II zur Herstellung von N,N'-Di- alkyl-1,2-diphenyläthylendiaminen	96
1.6.	Verfahren I zur Aufarbeitung der Re- duktionsprodukte	97
1.7.	Verfahren II zur Aufarbeitung der Re- duktionsprodukte	97
1.8.	Verfahren zur analytischen Bestimmung des Diastereomerenverhältnisses	97
1.9.	Verfahren I zur präparativen Trennung der diastereomeren Acethylendiamine	97
1.10.	Verfahren II zur präparativen Trennung der diastereomeren Äthylendiamine	98
1.11.	Verfahren II zur präparativen Trennung der diastereomeren Äthylendiamine	98
1.12.	Verfahren zur Spaltung von Methyläthern	98
1.13.	Verfahren I zur Spaltung von Benzyläthern	99
1.14.	Verfahren II zur Spaltung von Benzyläthern	99
1.15.	Verfahren III zur Spaltung von Benzyl- äthern	99
1.16.	Verfahren zur Herstellung von 1,3-Di- alkyl-4,5-diphenylimidazolidinen	99
1.17.	Verfahren zur Herstellung von meso-1,2- Di-(2'-hydroxyphenyl)-äthylendiaminen	100
1.18.	Verfahren zur Herstellung von N,N'-Di- aryliden-1,2-diphenyläthylendiaminen	100
1.19.	Verfahren zur Herstellung von meso-1,2- Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin	101
1.20.	Verfahren zur Herstellung von racem- 1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin	101
1.21.	Verfahren zur Trennung von racem-1,2- Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin in seine optische Antipoden	102

1.22.	Verfahren zur Herstellung von optisch aktivem N,N'-Dibutyryl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)- äthylendiamin	102
1.23.	Verfahren zur Herstellung von optisch aktivem N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-methoxy- phenyl)-äthylendiamin	103
2.	Verbindungen	104
	Daten der Verbindungen 2.1 bis 2.75	
3.	Bestimmung der physikalischen Daten	133
3.1.	Verteilungskoeffizienten	133
3.2.	Multiplikative Verteilung der Reaktions- gemische	133
3.3.	Schmelzpunkte	134
3.4.	Spektren	134
3.5.	CHN-Analysen	134
3.6.	Bestimmung der hRF-Werte	134
3.7.	Bestimmung der optischen Drehung	
3.8.	Messung der Radioaktivität	135
3.8.1.	Meßgeräte	135
3.8.2.	Meßdaten	135
3.8.3.	Szintillatoren	135
3.8.4.	³ H markierte Substanzen	135
3.9.	Bereitung der Substanzen für Tierversuche	136
4.	Methodik der Pharmakologischen Prüfungen	137
4.1.	Methodik der Untersuchungen am Östrogen- rezeptor in vitro	137
4.2.	Uterotroper Test	142
4.3.	Antiuterotroper Test	143

VII

4.4.	Kolpotroper Test	144
4.5.	Testung am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinom der Ratte	145
4.6.	Methodik der radioimmunologischen Bestimmung von Östradiol im Serum	147
4.7.	Methodik der radioimmunologischen Bestimmung von Ratten-Prolaktin (r-PRL) im Serum	151
4.8.	Bestimmung der Serumprolaktin-senkenden Wirkung	155
4.9.	Enzymatische Untersuchung von DMBA-induzierten Mammatumoren	155
E.	Zusammenfassung	158
F.	Literaturverzeichnis	161

A. Einleitung

Im Rahmen von Untersuchungen zur Entwicklung mammatumorhemmender Antiöstrogene wurden in unserem Arbeitskreis Verbindungen aus der Klasse der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine als wirksam erkannt (98, 20, 112).

Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, daß im Ring halogenierten bzw. hydroxylierten Verbindungen besonderes Interesse zukommt.

Aufgabe dieser Arbeit ist die Synthese und pharmakologische Prüfung stellungsisomerer N,N'-Dialkyl-1,2-di-(hydroxyphenyl)-äthylendiamine und N,N'-Dialkyl-1,2-di-(chlorhydroxyphenyl)-äthylendiamine.

An pharmakologischen Daten wurden bestimmt

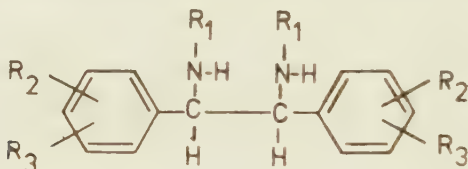
- 1) Oestradiol-Rezeptor-Affinität
- 2) Reversibilität der Diphenyläthylendiamin-Rezeptor-Komplexe
- 3) Uterotrope Wirkung
- 4) Kolpotrope Wirkung
- 5) Antiuterotrope Wirkung
- 6) Beeinflussung des DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinoms der Ratte
- 7) Beeinflussung der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese am Walker-256-Carcinosarkom in vitro
- 8) Bestimmung der cytociden Wirkung am Walker-256-Carcinosarkom in vitro
- 9) Beeinflussung des Serumprolaktin-Spiegels

B. Chemie der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine

1. Herstellung

1.1. Syntheseverfahren

Es wurden im wesentlichen 3 Gruppen von substituierten N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamin-dihydrochloriden ($\Delta\Delta\Delta \times 2\text{HCl}$) hergestellt.



Substanzklasse 1: $R_1 = n$ Butyl

$R_2 = \text{H}; \text{Cl}$ (in 2, 3 oder 4-Stellung)

$R_3 = \text{OCH}_3$; (in 2, 3 oder 4-Stellung)

O-Benzyl; (in 4-Stellung)

Substanzen Nr. 2.30 a - 2.35 a; 2.49a und

2.52 a

(Racemate)

2.30 b - 2.35 b; 2.49 b und

2.52 b

(Mesoformen)

Substanzklasse 2: $R_1 = n$ -Butyl

$R_2 = \text{H}; \text{Cl}$ (in 2, 3 oder 4-Stellung)

$R_3 = \text{OH}$ (in 2, 3 oder 4-Stellung)

Substanzen Nr. 2.43 a - 2.48 a (Racemate)

2.43 b - 2.48 b (Mesoformen)

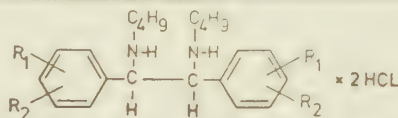
Substanzklasse 3: $R_1 = \text{Alkyl } C_1 - C_6$ gerade- und verzweigt-
kettig

$R_2 = H$

$R_3 = 4-(OCH_3)$; 4-(O-Benzyl); 4-OH

Substanzen Nr. 2.36 a - 2.42 a; 2.50 a und
2.51a, 2.53, 2.55, 2.57, 2.59,
2.61, 2.63 (Racemate)
2.36 b - 2.42 b; 2.50 b,
2.51 b, 2.54, 2.56, 2.58, 2.60,
2.62, 2.64 (Mesoformen)

Tabelle 1: Meso- und racem-N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyläthylendiamin-dihydrochloride
(Substanzklasse 1 und 2) physikalisch-chemische Daten.



Verb.Nr.	R ₁	R ₂	R ₂ **		n _D 20°	ppm - Werte		LM	K*	LS	Lit.
			Fl I	Fl II		aromat.H.	-H				
2.30	a	2-OCH ₃	0,71	0,38	215°	7,4 - 6,7 m	5,23 s	CD ₃ OD	18,3	IV	
	b	2-OCH ₃	0,26	0,69	215°	7,7 - 6,8 m	5,2 s	CD ₃ OD	2,88	IV	
2.31	a	3-OCH ₃	0,84	0,34	238°	7,16-6,43 m	4,4 s	CDCl ₃	10	III	
	b	3-OCH ₃	0,79	0,80	229°	7,73-6,86 m	5 s	CDCl ₃	1,84	III	
2.32	a	4-OCH ₃	0,73	0,46	219-220°	7,3 - 7,1 m	5,26 s	CD ₃ OD	100	IV	
	b	4-OCH ₃	0,35	0,85	214°	7,4 - 7,1 m	5,13 s	CD ₃ OD	2,85	IV	
2.33	a	2-OCH ₃	0,45	0,3	175°	7,33-6,86 m	5,3 s	CD ₃ OD	50	I	
	b	2-OCH ₃	0,11	0,4	193°	7,4 - 6,86 m	4,9 s	CD ₃ OD	0,15	I	
2.34	a	3-OCH ₃	0,75	0,63	181°	7,5 - 6,86 m	5,38 s	CD ₃ OD	20	I	
	b	3-OCH ₃	0,42	0,72	180°	7,72-7,1 m	5,17 s	CD ₃ OD	0,12	I	
2.35	a	4-OCH ₃	0,69	0,26	180°	7,47-6,9 m	5,23 s	CD ₃ OD	20	I	
	b	4-OCH ₃	0,38	0,64	194°	7,67-7,05 m	4,9 s	CD ₃ OD	0,08	I	
2.49	a	4-OCH ₂ -Ph	0,87	0,28	131°	7,2 (m)	5,34 (s)	D ₂ O-DMSO	33,3		(6)
	b	4-OCH ₂ -Ph	0,72	0,46	205 80°	7,4 (m)	5,22 s	D ₂ O-DMSO	6,2		
2.52	a	4-OCH ₃ -Ph	0,8	0,32	100-5°	7,66-6,83 (m)	5,3 (s)	CD ₃ OD	+		
	b	4-OCH ₃ -Ph	0,62	0,5	216°	7,9 - 7,16 (m)	5,1 s	CD ₃ OD	+		
2.43	a	2-OH	0,47	0,3	118°	7,26-6,8 (m)	3,86 (s)	CDCl ₃	+		
	b	2-OH	0,42	0,33	141°	7,38-6,78 (m)	3,96 (s)	CDCl ₃	+		
2.44	a	3-OH	0,85	0,38	17°	7,4 - 6,7 (m)	3,33 (s)	CDCl ₃	+		
	b	3-OH	0,73	0,2	100°	7,63-6,88 (m)	3,84 (s)	CDCl ₃	+		
2.46	a	2-OH	0,36	0,63	220°	7,4 - 6,8 (m)	5,35 (s)	CD ₃ OD	+		
	b	2-OH	0,16	0,9	200°	7,66-6,9 (m)	5,36 (s)	CD ₃ OD	+		
2.47	a	1-OH	0,88	0,35	200°	7,26-6,66 (m)	5,13 (s)	CD ₃ OD	+		
	b	1-OH	0,27	0,5	200°	7,56-6,59 (m)	5,1 (s)	CD ₃ OD	+		
2.48	a	4-OH	0,22	0,1	134°	7,33-6,7 (m)	5,20 (s)	CD ₃ OD	+		
	b	4-OH	0,19	0,13	122°	7,33-6,7 (m)	5,1 (s)	CD ₃ OD	+		

Abkürzungen: a = Racem-Form, b = Meso-Form, Fl = Fließmittel, LM = Lösungsmittel

*K = Verteilungskoeffizient in den Lösungsmittelsystemen LS I - V

(Zusammensetzung siehe Experimenteller Teil)

** MERCK HF 254 Fertigplatten Fl-Zusammensetzung siehe Experimenteller Teil

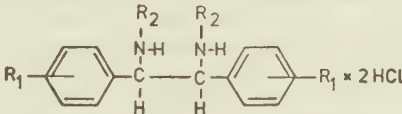
+) = mit LS I-V keine analytische Verteilung möglich

a) Ausnahme der Regel I (ppm aromat.H: a > b)

b) Ausnahme der Regel II (ppm <-H: a < b)

c) Als Base vermessen

Tabelle 2: Meso und racem-N-N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin -dihydrochloride
(Substanzklasse 3) physikalisch-chemische Daten.

											
Verb. Nr.	R ₁	R ₂	hRf **		Schmp.	ppm-Werte		LM	K*	LS	Lit.
			Fl 1	Fl 2		aromat. H	-H				
2.36 a	4-OCH ₃	-CH ₃	0,16	0,13	218°	7,40-6,93 (m)	5,15 (s)	CD ₃ OD	100	v	(5)
b	4-OCH ₃	-CH ₃	0,04	0,19	228°	7,87-7,03 (m)	4,93 (s)	d ₆ -DMSO	0,11		
2.37 a	4-OCH ₃	-CH ₂ -CH ₃	0,42	0,24	187°	7,40-6,58 (m)	5,21 (s)	d ₆ -DMSO	50	0,15	(5)
b	4-OCH ₃	-CH ₂ -CH ₃	0,20	0,38	208°	7,59-6,90 (m)	4,90 (s)				
2.38 a	4-OCH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	0,63	0,26	134°	7,40-6,87 (m)	5,18 (s)	CD ₃ OD	25	1,0	(5)
b	4-OCH ₃	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	0,30	0,60	204°	7,43-6,93 (m)	3,77 (s)				
2.39 a	4-OCH ₃	-CH-(CH ₃) ₂	0,19	0,52	153°	7,33-6,67 (m)	5,30 (s)	CD ₃ OD	25	0,75	(5)
b	4-OCH ₃	-CH-(CH ₃) ₂	0,13	0,73	249°	8,00-7,12 (m)	5,27 (s)				
2.40 a	4-OCH ₃	-CH ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃	0,74	0,31	202°	7,43-6,80 (m)	5,18 (s)	CD ₃ OD	+)		
b	4-OCH ₃	-CH ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃	0,48	0,73	211°	7,93-7,12 (m)	5,14 (s)				
2.41 a	4-OCH ₃	-(CH ₂)-CH-(CH ₃) ₂	0,9	0,39	200°	7,43-6,87 (m)	5,20 (s)	CD ₃ OD	+)		
b	4-OCH ₃	-(CH ₂)-CH-(CH ₃) ₂	0,63	0,73	223-6°	7,87-7,13 (m)	5,08 (s)				
2.42 a	4-OCH ₃	-CH ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	0,92	0,83	191°	7,43-6,80 (m)	5,10 (s)	CD ₃ OD ^{b)}	+)		
b	4-OCH ₃	-CH ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	0,77	0,50	128-30°	7,87-7,07 (m)	5,13 (s)				
2.50 a	4-OCH ₂ -Ph	-CH ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃	0,81	0,38	109°	7,73-6,76 (m)	4,36 (s)	CF ₃ -COOD	+)		
b	4-OCH ₂ -Ph	-CH ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃	0,78	0,73	199°	8,16-7,26 (m)	4,13 (s)				
2.51 a	4-OCH ₃ -Ph	-CH ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	0,81	0,32	95-99°	7,56-6,83 (m)	5,26 (s)	CD ₃ OD	+)		
b	4-OCH ₃ -Ph	-CH ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	0,78	0,81	99°	7,66-6,93 (m)	3,73 (s)				
2.53 rac.	4-OH	-CH ₃	0,0	0,02	174°	7,10-6,60 (m)	3,43 (s) ^{C)}	d ₆ -DMSO	+)		
2.54 meso	4-OH	-CH ₃	0,0	0,04	226°	7,77-6,93 (m)	4,80 (s) ^{C)}				
2.55 rac.	4-OH	-CH ₂ -CH ₃	0,24	0,04	198°	7,41-6,50 (m)	5,08 (s)	d ₆ -DMSO	+)		
2.56 meso	4-OH	-CH ₂ -CH ₃	0,08	0,07	204°	7,60-6,33 (m)	4,92 (s)				
2.57 rac.	4-OH	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	0,30	0,05	178°	7,33-6,87 (m)	5,50 (s)	CD ₃ OD	+)		
2.58 meso	4-OH	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	0,10	0,06	229°	7,57-6,83 (m)	5,00 (s)	d ₆ -DMSO			
2.59 rac.	4-OH	-CH-(CH ₃) ₂	0,25	0,03	184°	7,33-6,72 (m)	5,23 (s)	CD ₃ OD + CDCl ₃	+)		
2.60 meso	4-OH	-CH-(CH ₃) ₂	0,05	0,12	174°	7,73-7,00 (m)	4,93 (s)	CD ₃ OD			
2.61 rac.	4-OH	-CH ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃	0,55	0,08	104° c)	7,43-6,85 (m)	5,33 (s)	CD ₃ OD ^{C)}	+)		
2.62 meso	4-OH	-CH ₂ -(CH ₂) ₃ -CH ₃	0,40	0,18	147°	7,27-6,77 (m)	3,30 (s)				
2.63 rac.	4-OH	-CH ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	0,89	0,10	200°	6,97-6,50 (m)	4,83 (s)	d ₆ -DMSO ^{C)}	+)		
2.64 meso	4-OH	-CH ₂ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	0,78	0,26	220°	7,40-6,78 (m)	4,73 (s)				

Abkürzungen: Siehe Tabelle 1

Für die Herstellung der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylen-diamine (ÄDA) wurden zunächst 2 bekannte Reduktionsverfahren angegeben, die unter geeigneten Bedingungen neben N-Alkylbenzylaminen überwiegend N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthyldiamine liefern.

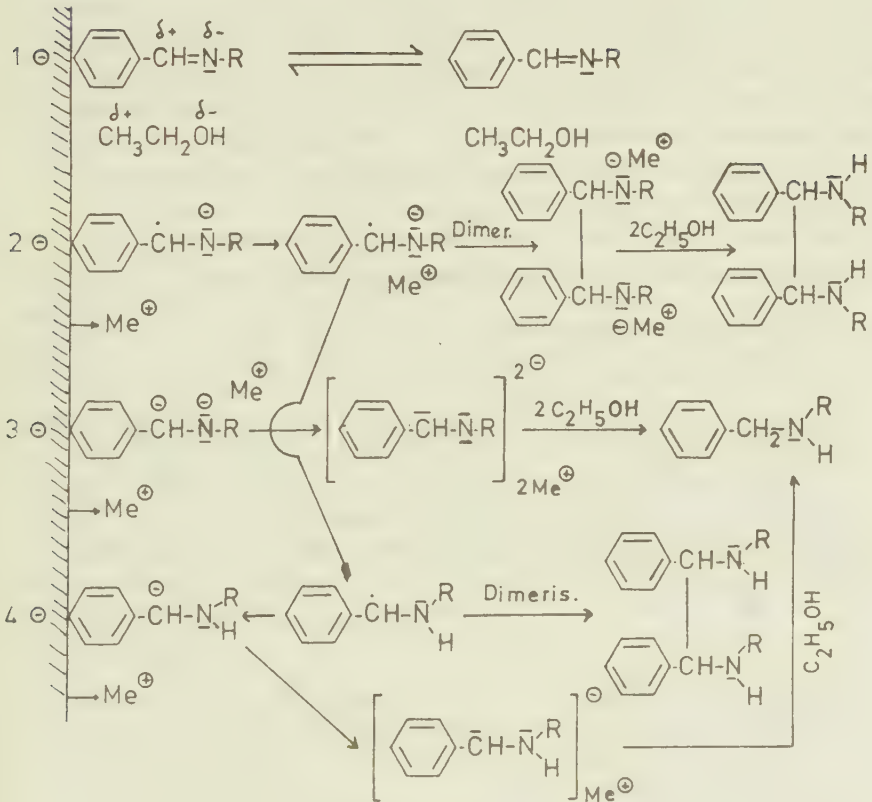
Es wurden folgende Reduktionsmittel verwendet:

I. HgCl_2 -aktiviertes Aluminium (13, 14)

II. Benzpinakol (15)

Alle Verbindungen wurden zunächst mit aktiviertem Aluminium reduziert. Bei schlechten Ausbeuten wurde als Alternative die Reduktion mit Benzpinakol gewählt.

Reaktionsschema für Syntheseweg I:



1. Anlagerung von Aldimin und Lösungsmittelmolekülen an der Aluminiumoberfläche, Bildung einer Adsorbatschicht
2. 1. Elektronentransfer, Bildung des Radikalanions, Desorption des Ionenpaars, Dimerisierung und Bildung von 1,2-Diphenyl-äthylendiamin (ÄDA) durch Protonierung von Radikal durch Protonierung und Dimerisierung zu ÄDA
3. 2. Elektronentransfer, Bildung des Dianions, Desorption und Protonierung zu N-Alkyl-aryl-methyl-amin (N-Alkylbenzylamin, AMA)
4. 2. Elektronentransfer, Bildung des Carbenanions aus dem Radikal (bevorzugt), Desorption und Protonierung zu AMA (6)

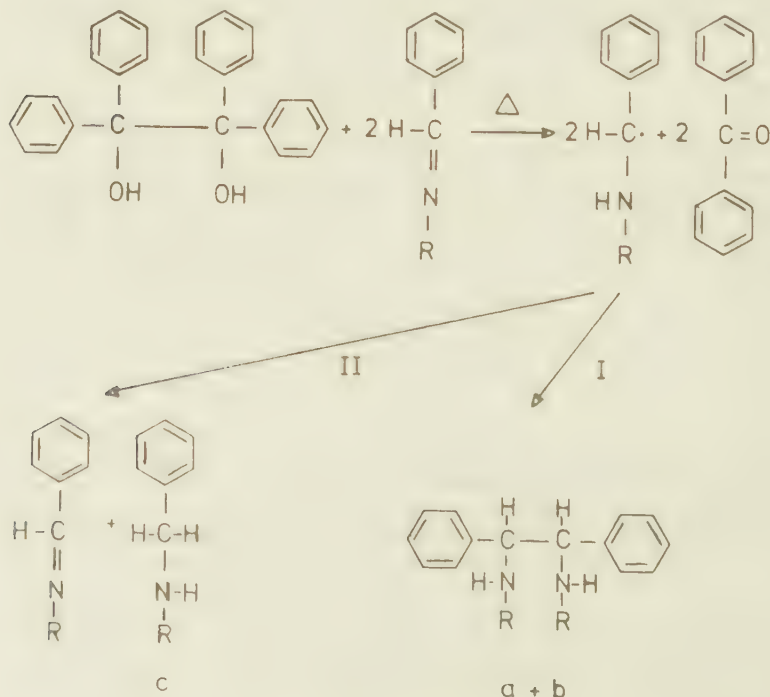
R = Alkyl

Die Reduktion von Benzylidenalkylaminen beginnt mit der Anlagerung von Imin- und Alkoholmolekülen an der Aluminiumoberfläche -Schritt 1- (6 S. 16 - 19).

Im Primärschritt geht das Aldimin durch Aufnahme eines Elektrons in das entsprechende Radikalanion über, das zum Äthylendiamin-dianion dimerisiert (Schritt 2, Hauptweg für die Bildung von ÄDA), oder durch Aufnahme eines Protons und eines weiteren Elektrons über die Stufe eines Carbanions und anschließender Äthanol-lyse zum Benzylalkylamin reduziert wird (Schritt 4, Hauptweg für die Bildung von AMA).

Die Ausbeutenverhältnisse sind stark vom Mengenverhältnis Aldimin:Alkohol und von der Iminstruktur abhängig.

Reaktionsschema für Syntheseweg II: (20)



Durch Erhitzen von Benzpinakol in Isopropanol lassen sich bei 130° Ketylradikale erzeugen. Diese bilden mit Schiff'schen Basen und Benzophenon Aldimylradikale, die unter Bildung von ADA sowohl dimerisieren als auch in geringem Ausmaß disproportionieren (Bildung von AMA und Schiff'scher Base). Auch hier sind die Ausbeutenverhältnisse stark von der Iminstruktur abhängig (15, 20).

1.2. Trennung der diastereomeren N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochloride

Die nach B.1 gewonnenen Reduktionsprodukte enthalten racem- bzw. meso-ADA x 2HCl und AMA x HCl.

AMA wurde meist durch Vakuumdestillation aus dem Reaktionsgemisch abgetrennt, die diastereomeren ADA x 2HCl wurden durch Craig-Verteilung oder fraktionierte Kristallisation rein dargestellt. Die Löslichkeit der ADA x 2HCl ist in protonischen Solventien in der Regel sehr gut. In apolaren, aprotonischen Lösungsmitteln sind sie jedoch unlöslich. Die diastereomeren ADA x 2HCl lassen sich in der Mehrzahl der Fälle durch Umkristallisieren aus MeOH, EtOH und CHCl_3 trennen. Zur Erniedrigung der Solvatation kann Et_2O zugegeben werden.

1.2.1. Trennung der diastereomeren N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochloride durch fraktionierte Kristallisation

Bei allen untersuchten Diastereomerengemischen fällt beim Umkristallisieren der Dihydrochloride zuerst die Mesoform aus. Als 2. Fraktion konnte racem-ADA x 2HCl in reiner Form isoliert werden. Bei den Reduktionsansätzen 2.42, 2.50, 2.51 und 2.52, bei denen AMA durch Destillation nicht abtrennbar war, fiel zwischen den meso- und racem-ADA x 2HCl-Fractionen AMA x HCl aus. Bei Versuch 2.32 kristallisierte in Ausnahme dieser Regel AMA x HCl vor meso- und racem-ADA x 2HCl aus.

Bei vielen Versuchen enthielt die Mutterlauge noch erhebliche Mengen an Racemform, die durch die lösungsvermittelnden Eigen-

schaften der harzigen Nebenprodukte nicht restlos auskristallisierte. In diesen Fällen war eine Abtrennung der Racemform durch multiplikative Ionenpaarverteilung angezeigt.

Diastereomere ADA mit phenolischen OH-Gruppen wurden bevorzugt als Basen durch fraktionierte Kristallisation in Aether getrennt (Methode D1.7 und D1.10). Auch bei dieser Aufarbeitungsmethode fiel die Mesoform als 1. Fraktion und die Racemform als 2. Fraktion an. Nicht abdestillierte AMA der Ansätze 2.44 und 2.47 kristallisierten noch vor der Mesoform.

1.2.2. Auftrennung der isomeren N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4,3, bzw. 2-methoxyphenyl)-äthylendiamine durch multiplikative Verteilung.

Die Trennung der diastereomeren N,N'-Dibutyl-1,2-di-(methoxyphenyl)-äthylendiamine wurde eingehend am Beispiel der Verbindung 2.35 a, b untersucht. Als brauchbar erwiesen sich Lösungsmittelsysteme aus Chloroform und HCl verschiedener Konzentration. Die Verteilung der diastereomeren ADA erfolgt in diesem System bei pH 0-2 als Ionenpaare. Der Trennfaktor β ist stark von der Cl^- -Konzentration des Systems abhängig. Optimale Trenneffekte ($\beta = 267$) wurden mit $\text{CHCl}_3/0,1 \text{ N HCl}$ erhalten (Abb. 2). Dieser Trennfaktor verringert sich um eine Größenordnung bei Verwendung von 1 N HCl als wässr. Phase ($\beta = 26,8$) (Ursache: bei konst. $K_{2.35a}$ erfolgt eine Erhöhung von $K_{2.35b}$ von 0,081 auf 1,33). Die starke Abnahme des Verteilungskoeffizienten der Mesoverbindung beim Übergang von 1 N- zu 0,1 N-HCl erklärt sich mit der geringen Cl^- -Ionenkonzentration des Lösungsmittelsystems.

Nach Higuchi (26, 27) besteht eine lineare Beziehung zwischen Cl^- -Konzentration und $\log. K$. Durch die geringere Cl^- -Konzentration bei den Systemen $\text{CHCl}_3/0,05 \text{ N HCl}$ und $\text{CHCl}_3/0,01 \text{ N HCl}$ kommt es auch zu einer starken Erniedrigung der K-Werte der Raceform ($K_{2.35a}$ von 3,70 bzw. 1,724) bei gleichzeitig nur geringfügiger Veränderung der K-Werte der Mesoform. Dadurch erniedrigen sich die β -Werte erheblich. Bei Verwendung des Systems $\text{CHCl}_3/0,001 \text{ N HCl}$ liegen Meso- und Racemform teilweise als Monohydrochlorid

vor (Abb. 5). Dadurch ist eine Auftrennung des Gemisches aus diesem System nicht möglich ($\beta = 1,38$). Das durch Verteilung in $\text{CHCl}_3/0,1 \text{ N HCl}$ erhaltene Racemat enthält einen Farbstoff der die Kristallisation erschwert. Bei Verwendung des Lösungsmittels $\text{CHCl}_3/0,05 \text{ N HCl}$ konnte eine partielle, bei Verwendung des Systems $\text{CHCl}_3/0,01 \text{ N HCl}$ eine vollständige Abtrennung der harzigen Nebenprodukte erzielt werden. Bei der präparativen Reindarstellung von Substanz 2.35a und 2.35b wurde aus dem durch Abdestillieren von 2.35c gewonnene Diastereomerengemisch durch einen 12-stufigen Craig-Grundprozeß unter Verwendung von $\text{CHCl}_3/0,1 \text{ N HCl}$ zuerst die Mesoform und anschließend durch 5 Verteilungsschritte mit Lösungsmittelsystem $\text{CHCl}_3/0,01 \text{ HCl}$ das Racemat vom harzige- Nebenprodukt abgetrennt. Diastereomerengemische mit OCH_3 -Gruppe in 3- bzw. 2-Stellung (2.34 a b und 2.33 a b) verhalten sich ähnlich wie 2.35 a b. Die K-Werte der Racemate liegen im selben Bereich (21,74; 18,52; 50,0; LS I); die K-Werte der Mesoformen nehmen in der Reihenfolge 4- OCH_3 , 3- OCH_3 , 2- OCH_3 zu (Tabelle 4). Die β -Werte liegen in allen Fällen sehr hoch ($\beta = 157$ bis 340).

Tabelle 3: Verteilungsdaten von N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid (Verb.Nr. 2.35 a racem, und 2.35 b meso) in Lösungsmittelsystemen mit fallender Cl⁻-Konzentration, ermittelt durch einstufige Ionenpaarverteilung
V = 1,6 Organische Phase: Chloroform

HCl-Konzentration der wässrigen Phase	K-Wert		β-Wert
	racem	meso	
1 n	25,71	1,33	16,8
0,1 n	21,74	0,081	267,4
0,05 n	3,70	0,057	64,8
0,01 n	1,724	0,05	34,5
0,001 n	1,162	0,84	1,38

Tabelle 4: Verteilungsverhalten der isomeren N,N'-Dibutyl-1,2-di-(methoxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochloride in LS I ermittelt durch einstufige Ionenpaarverteilung
V = 1,6

Verl.-Nr.	is	K	β
2.33 a b	2-OCH ₃	50,0 0,147	340,0
2.34 a b	3-OCH ₃	18,52 0,117	157,4
2.35 a b	4-OCH ₃	21,74 0,081	267,4

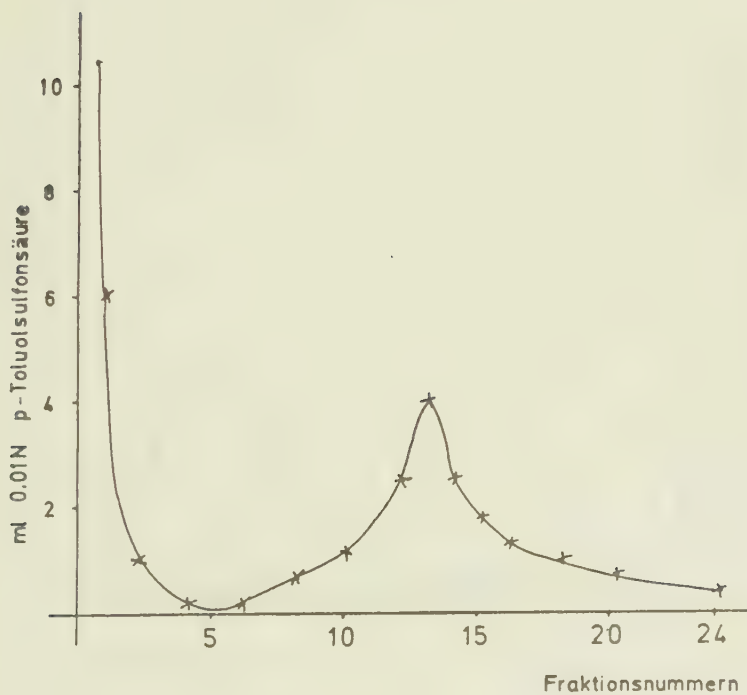


Abbildung 1: Auftrennung eines Gemisches von 2.35 a, b durch
 Craig-Verteilung;
 Verfahren: 24-stufiger Craig-Grundprozeß
 $V = 1,6$ LS CHCl_3 / 1 N HCl

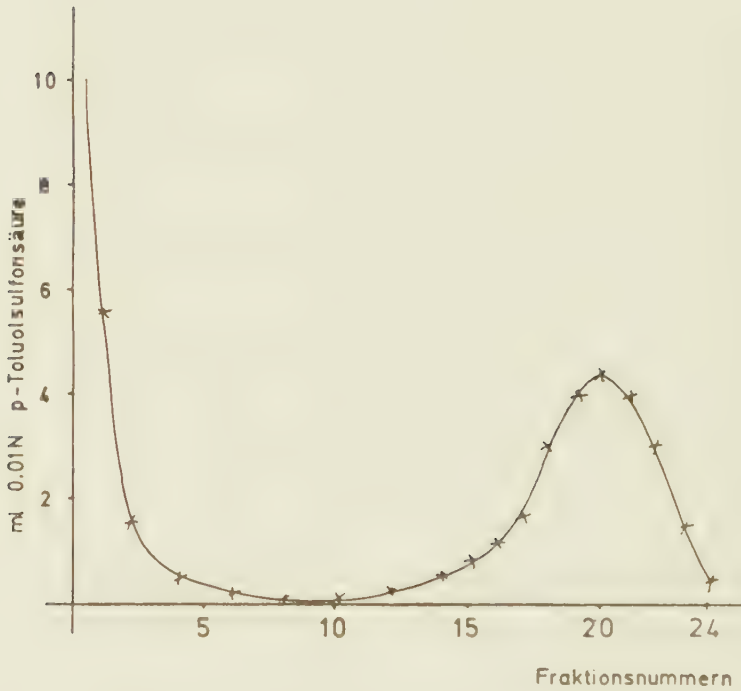


Abbildung 2: Auftrennung eines Gemisches von 2.35 a, b durch
 Craig-Verteilung;
 Verfahren: 24-stufiger Craig-Grundprozeß
 $V = 1,6$ LS $\text{CHCl}_3/0,1 \text{ HCl}$

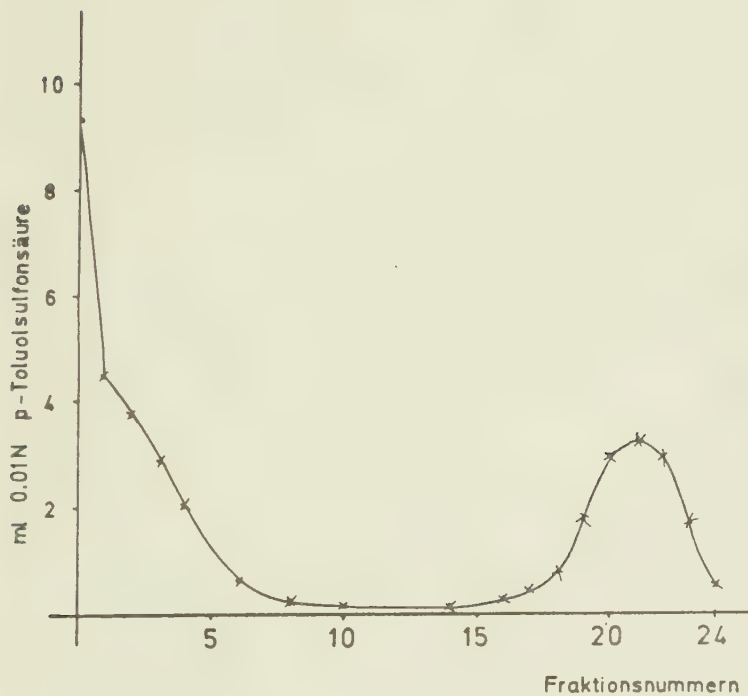


Abbildung 3:

Auftrennung eines Gemisches von 2.35 a, b durch
Craig-Verteilung.

Verfahren: 24-stufiger Craig-Grundprozeß

$V = 1,6$ LS $\text{CHCl}_3/0,05 \text{ N HCl}$

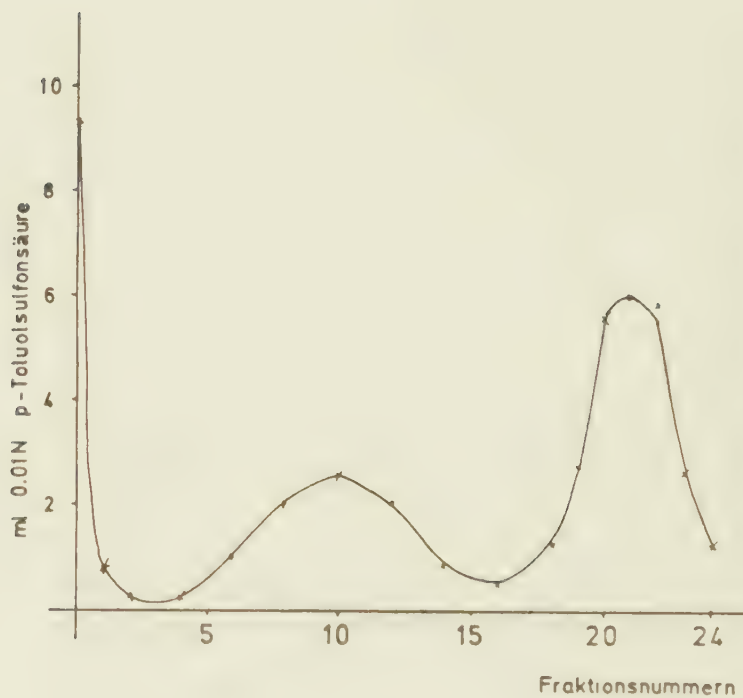


Abbildung 4: Auftrennung eines Gemisches von 2.35 a, b durch Craig-Verteilung.

Verfahren: 24-stufiger Craig-Grundprozeß

$V = 1,6$ LS $\text{CHCl}_3 / 0,01 \text{ N HCl}$

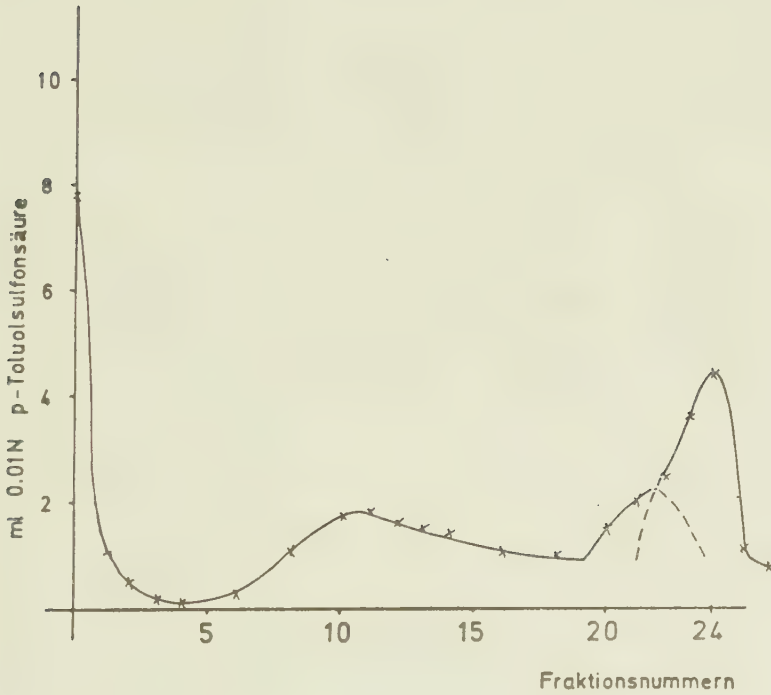


Abbildung 5:

Auftrennung eines Gemisches von 2.35 a, b durch
Craig-Verteilung.

Verfahren: 24-stufiger Craig-Grundprozeß

$V = 1,6$ LS $\text{CHCl}_3/0,001 \text{ N HCl}$

1.3. Vergleichende Betrachtung der Syntheseverfahren I und II

Die Reduktion von Schiffbasen mit freier phenolischer OH-Gruppe brachte bei Herstellung nach Verfahren I und II nur geringe Ausbeuten an ÄDA (Racemat meist unter 10% bezogen auf Schiffbase). Sie sind am größten bei Schiffbasen mit phenolischen OH-Gruppe in 2-Stellung und nehmen ab bei Verlagerung der OH-Gruppe in die 3-Stellung. Die Reduktion von Schiffbasen mit phenolischer OH-Gruppe in 4-Stellung führt zu einem harzigen Vielkomponentengemisch, aus dem kein ÄDA isoliert werden konnte.

Bei der Reduktion von Schiffbasen mit Cl und OH im Ring ergeben sich im Vergleich zu nur OH-substituierten Schiffbasen insgesamt höhere Ausbeuten an ÄDA. Auch hier fällt die Ausbeute von der 2- zur 3-Stellung ab. In jedem Fall läuft die Dimerisierung stark zu Gunsten der Mesoform ab (racem:meso bis 1:4)

Ausbeuten an Dimerprodukt bei Reduktion von Schiffbasen mit phenolischer OH-Gruppe

19

1.4. Herstellung von N,N'-Dialkyl-1,2-di-(hydroxy- und chlorhydroxyphenyl)-äthylendiaminen durch Spaltung ihrer Methyl- und Benzyläther

Die Reduktion von Schiffischen Basen mit phenolischen OH-Gruppen brachte in der Regel unbefriedigende Ausbeuten an ADA. Schiffische Basen mit OH-Gruppen in 4-Stellung ergaben bei der Reduktion mit den beschriebenen Methoden Vielkomponentengemische, aus denen kein dimeres Reduktionsprodukt isoliert werden konnte.

1.4.1. Angewendete Methoden

1.4.1.1. Spaltung der Methyläther

Aus diesem Grunde wurden ADA mit phenolischen OH-Gruppen aus den Methyläthern hergestellt. N,N'-Dialkyl-1,2-di-(methoxyphenyl)-äthylendiamine sind durch Reduktion der entsprechenden Schiffischen Basen in hinreichender Ausbeute herstellbar. Aus den Reduktionsansätzen sind die diastereomeren ADA durch Abdestillieren von AMA und anschließender Kristallisation oder Craig-Verteilung in reinster Form isolierbar.

Zur Aetherspaltung der isomeren Methyläther kommen im wesentlichen folgende Methoden zur Anwendung:

1. AlBr_3 (wasserfrei) in Benzol
2. HBr / Eisessig
3. HI
4. Pyridinhydrochlorid

Bei Aetherspaltung mit wasserfreiem AlBr_3 (27) fielen mit Ausnahme von Substanz Nr. 2.45 die freien Phenole in ausreichenden Ausbeuten an (79 - 98% d.Th.). Eine Aetherspaltung von Verbindung 2.32a und b führte mit keinem der oben angegebenen Reagentien zum Ziel. Dünnschichtchromatogramme der Umsetzungsgemische zeigten im UV-Licht über die gesamte Laufstrecke verteilte stark fluoreszierende Produkte und gaben keinerlei Anhaltspunkte für die gesuchte Verbindung. Aus dem Gemisch konnten weder Phenol noch Ausgangsverbindung isoliert werden.

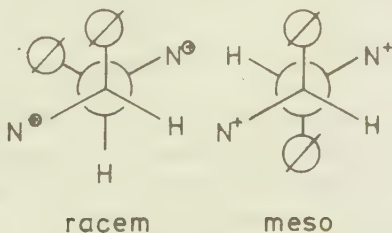
1.4.1.2. Spaltung der Benzyläther

Es wurde deshalb versucht, die Benzyläther der gewünschten Verbindung hydrogenolytisch zu spalten (7). Während die hydrogenolytische Spaltung der Substanzen 2.49 a, b, 2.50 a, b, 2.51 a, b in sehr hohen Ausbeuten (91,0 - 97,0%) gelang, war eine Spaltung von Substanz 2.52 a, b unter diesen Bedingungen nicht möglich. Ein Austausch der Lösungsmittel durch Eisessig (Verf. 1.14) führte ebensowenig zum Erfolg, wie die Erhöhung der Temperatur (Verf. 1.15) und des Druckes. In keinem Falle war ein Verbrauch an H_2 zu verzeichnen.

1.5. Konfigurative Zuordnung der Diastereomeren:

1.5.1. 1H NMR-Spektroskopie

R. SCHOENENBERGER et al. (8) konnten aufgrund der unterschiedlichen NMR-Spektren diastereomere ADA x 2HCl konfiguratив zuordnen: im Vergleich zur Mesoform sind die aromatischen Protonen der Racemform stärker abgeschirmt und damit diamagnetisch verschoben (Regel I), die α -H-Atome dagegen schwächer abgeschirmt und paramagnetisch verschoben (Regel II). Die Spektren von racem- und meso-N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyl-äthylendiamin-dihydrochlorid in D_4 -Methanol zeigen in einem Temperaturbereich von -79 bis +38°C keine Veränderung der Bandenlage und -breite der für die Zuordnung entscheidenden aromatischen und α -ständigen Protonen. Daraus kann geschlossen werden, daß die diastereomeren ADA x 2HCl jeweils nur in einer Konformation vorliegen.



Diese Gesetzmäßigkeit erlaubt die Zuordnung diastereomerer ADA x 2HCl durch Vergleich ihrer NMR-Spektren.

Hinweise auf die vorliegende Konfiguration liefern ferner das Verteilungsverhalten im Lösungsmittelsystem CHCl_3/HCl , jedoch ist eine sichere Zuordnung aufgrund dieser Daten nicht möglich.

1.5.2. Verteilungskoeffizienten

Die Verteilungskoeffizienten der $\text{ADA} \times 2\text{HCl}$ im LS CHCl_3/HCl sind bei den Racematen (lipophiler) in der Regel größer als bei den entsprechenden Mesoformen.

1.5.3. hRF-Werte

Die mit dem essigsäuren Fließmittel (Äthylacetat CHCl_3 Liacoin/ Eisessig 50:15:20:30) auf Kieselgelplatten erhaltenen hRF-Werte weisen die Racemate in der Regel als lipophiler aus, während im neutralen Fließmittel (Benzol/Methanol 9:1) immer die Mesoformen die höheren hRF-Werte zeigen.

1.5.4. Schmelzpunkte

Nach J. Stern (22) zeigten bei Untersuchungen von Diastereomerenpaaren 90% aller Mesoformen einen höheren Schmelzpunkt als die entsprechenden Racemate. Bei den hier untersuchten 28 Diastereomerenpaaren konnte dieser Befund nicht bestätigt werden. Nur 71% der Mesoformen haben einen höheren Schmelzpunkt als die Racemate (20 von 28).

1.5.5. Ergebnisse

In den Tabellen 1 und 2 sind die vorstehend genannten für eine sterische Zuordnung in Betracht kommenden Eigenschaften, soweit ermittelt, aufgeführt. Anhand der Versuchsdaten lassen sich die diastereomeren $\text{ADA} \times 2\text{HCl}$ eindeutig zuordnen.

Regel I ist bei allen untersuchten Diastereomerenpaaren erfüllt. NMR-Regel II ist bei den Verbindungen 2.30, 2.31 und 2.42 nicht

erfüllt.

Auch bei Hoffmann (20) zeigen ÄDA mit Chlor in 2-Stellung und N-Hexyl-Verbindungen ein verändertes Verhalten. Nachdem aber die Verbindungen 2.43, 2.44 und 2.63/4, die durch Ätherspaltung aus 2.30, 2.31 und 2.42 synthetisiert wurden, durch NMR-Spektroskopie eindeutig sterisch zuzuordnen sind, kann auch die Konfiguration dieser 3 Verbindungen als gesichert gelten.

2. (+)- und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin

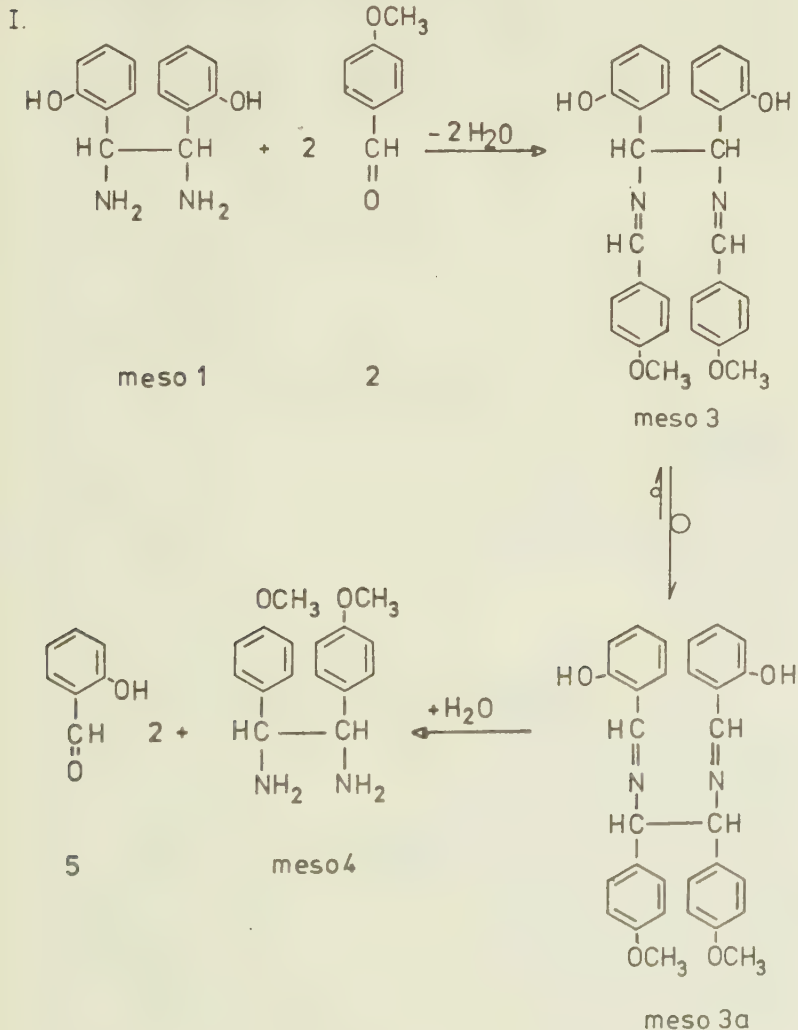
An der pharmakologischen Wirkung eines Racemats sind häufig die optischen Antipoden unterschiedlich stark beteiligt, wie an zahlreichen Beispielen wie Tranylcypromin (82), Ephedrin (83), 1-Methadon (84) und N'-Äthyl-Hexobarbital (85) gezeigt werden konnte. In manchen Fällen erweist sich ein Antipode als kompetitiver Antagonist des anderen, so daß nach Abtrennung der unwirksamen Form eine Potenzierung der Wirkung eintritt. Racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin zeigte eine ausgeprägte Wirkung am DMBA-induzierten Mammacarcinom der Ratte, während die Mesoform unwirksam war. Aus diesem Grunde war es von außerordentlichem Interesse, die Einzelwirkung der beiden optischen Antipoden zu untersuchen.

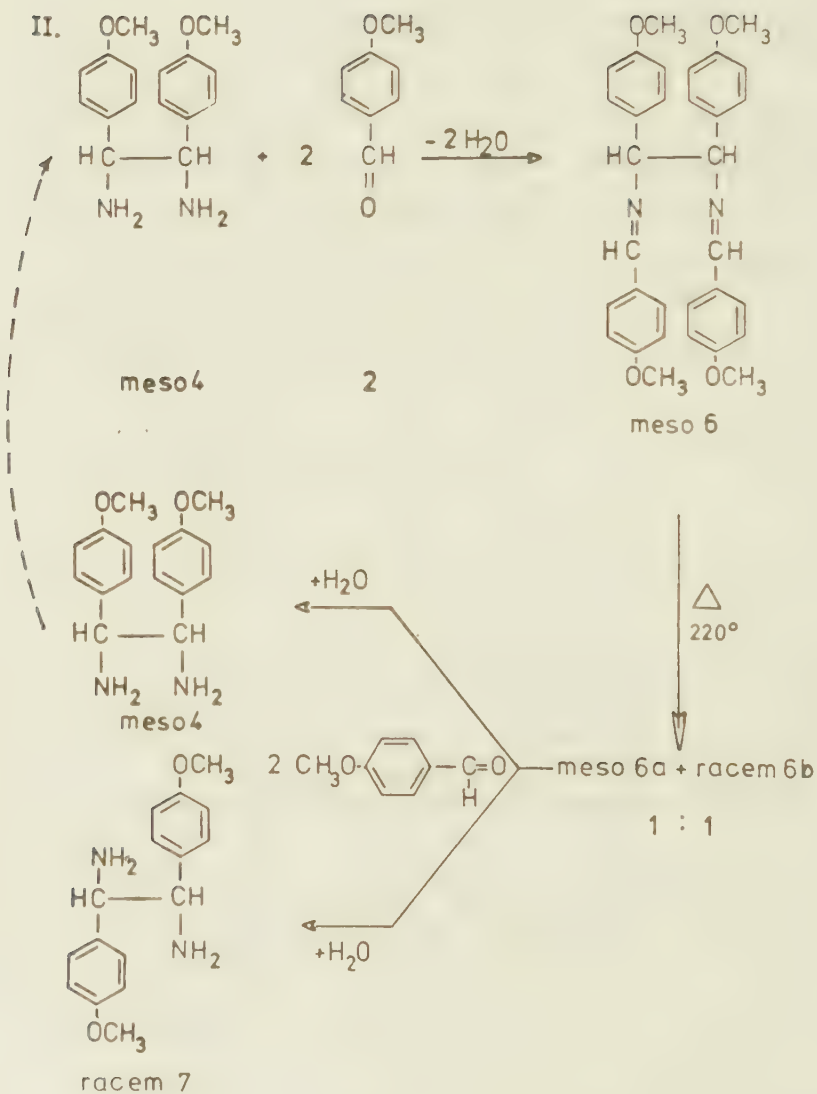
2.1. Versuche zur Trennung des Racemates

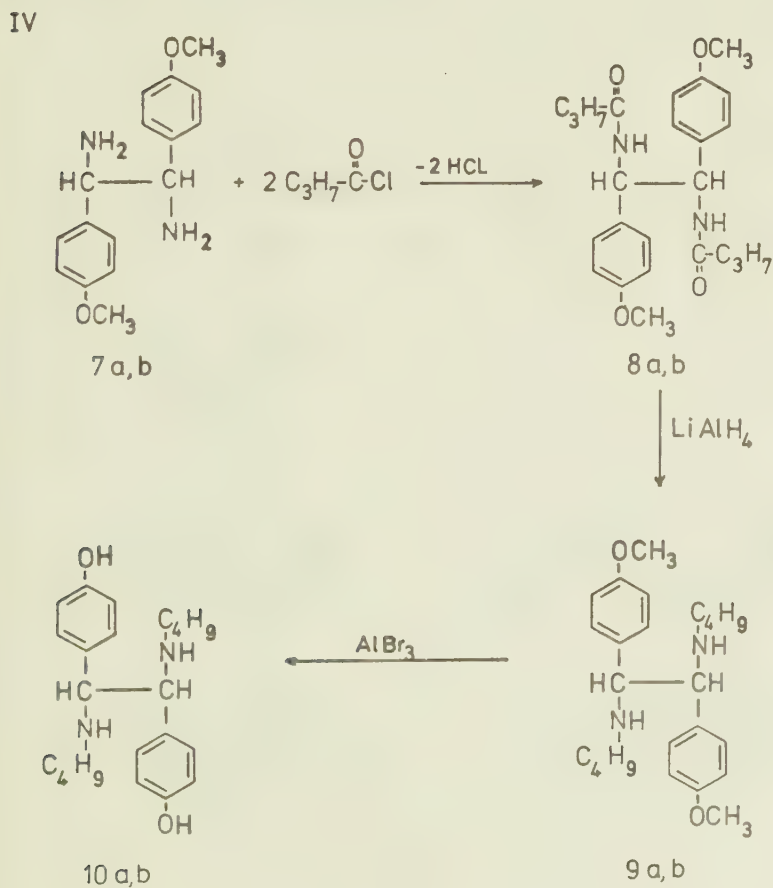
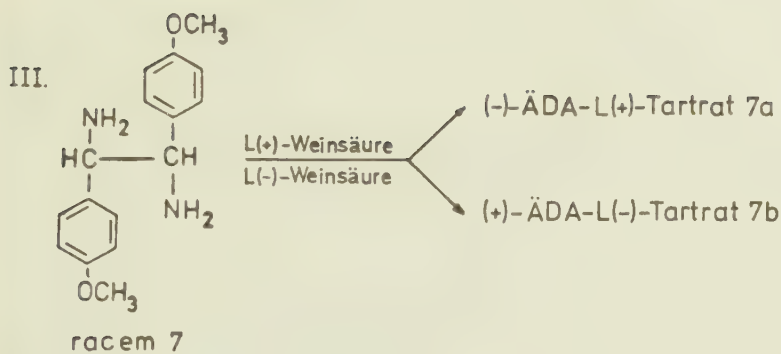
Schönenberger (21) gelang es erstmals am Beispiel von racem-N,N'-Dibutyl-1,2-diphenyläthylendiamin, dem ringsubstituierten Analogen zu Subst. Nr. 2.48a, die Auftrennung in seine optischen Antipoden mit Hilfe von d-Weinsäure $[\alpha]_{20}^D = -22^\circ$, 5% äthanol. Lösung). Es wurden analoge Versuche mit Substanz 2.48a und dessen Dimethyläther durchgeführt. Mit dieser Methode konnte eine Trennung der analogen ringsubstituierten Substanz nicht erreicht werden. Auch Variation des Lösungsmittels und der Mengenverhältnisse Base:optisch aktiver Säure, führten nicht zum Ziel. Versuche mit Campfersulfonsäure führten zu minimalen Anreicherungen ($[\alpha]_{46}^{25^\circ} = -1,8^\circ$ in Methanol). Aus diesem Grunde wurde versucht, eine Trennung auf der Stufe der primären 1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamine durchzuführen.

2.2. Synthese aus (+)- und (-)-1,2-Di(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin

Für die Synthese der optischen Antipoden wurde folgender Syntheseweg beschrieben:



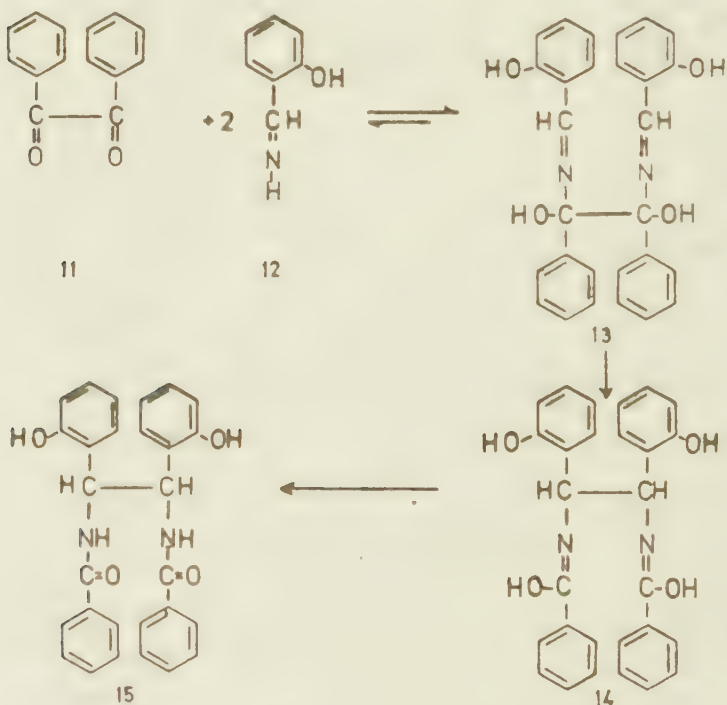




Zu I:

2.2.1. Ausgangsverbindung

Die Synthese der Ausgangsverbindung 1 erfolgte nach einer von Japp und Hooker (10) beschriebenen und von E. Goldschmitt und F. Vögtle (30) verbesserten Verfahren aus Benzil, Ammoniak und Salicylaldehyd. Der Reaktionsmechanismus ist noch nicht geklärt. Vögtle und Goldschmitt (9) vermuten, daß das mögliche Zwischenprodukt Salicylimin in einer S_N2 -Reaktion das Benzil angreift. Durch zweifache Addition könnte ein 1,5 ungesättigtes Diol, 13, entstehen, das mit einer 3,3' -Bindungsverschiebung in ein Tautomeres, 14, von 15 übergeht.

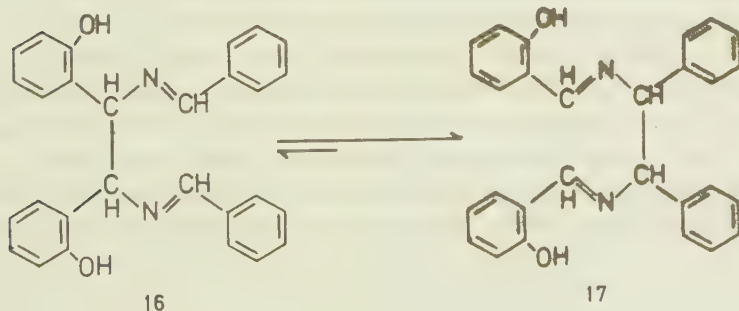


Die Ausgangsverbindung 1 ist durch saure Hydrolyse von 15 zugänglich.

2.2.2. meso-1,2-Di-(4'-Methoxyphenyl)-äthylendiamin durch Diaza-Cope-Umlagerung

2.2.2.1. Allgemeines

1,2-Diaryläthylendiamine waren bisher nur durch aufwendige Methoden wie reduktiver Aminierung (32, 33) oder Hydrobenzamid-Amarin-Umlagerung (34, 35) zugänglich. Vögtle und Goldschmitt (9) fanden in der Diaza-Cope-Umlagerung ein Syntheseprinzip, welches ausgehend von Carbonylverbindungen C-substituierte Äthylendiamine nicht nur in recht guten Ausbeuten, sondern auch ohne größeren präparativen Aufwand und vor allem stereospezifisch zugänglich machte. Sie zeigten an ausgewählten Beispielen, daß Diimine des 1,2-Di-(2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamins, 16, sich unter besonders milden Bedingungen (Acetonitril, 60°, 10 min) praktisch quantitativ umlagern (31). Dieser 'Salicyl-Effekt' kann einerseits auf eine durch die phenolische OH-Gruppe bedingte Protonenkatalyse, zum anderen auf die Ausbildung energetisch günstiger Wasserstoffbrückenbindungen im Produkt, 17, zurückgeführt werden.



2.2.2.2. Darstellung

Für die präparative Darstellung von meso-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin wurde das durch thermische Valenzisomerisierung des N,N'-Di-(4'-methoxybenzyliden)-meso-1,2-di-(2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamins 3, erhaltene Valenzisomere 3a, ohne vorherige Reinigung mit 2N H₂SO₄ hydrolysiert, wobei gleichzeitig der entstehende Salicylaldehyd mittels Wasserdampfdestillation abgetrennt wurde. Das Diamin 4 wurde mit 20%iger Natronlauge freigesetzt. Nicht vollständig hydrolysiertes 3a und nicht quantitativ entfernter Salicylaldehyd sind in NaOH löslich, weshalb 4 in sehr reiner Form auskristallisiert. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Chloroform/Äther ist es analysenrein.

Zu II:

Umlagerung von meso-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin zu einem Meso-Racem-Gemisch

2.2.3. Meso-dl-Stereoisomerisierung von 1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiaminen

2.2.3.1. Allgemeines

Durch elektrolytische Reduktion von Benzildioxim gelang es bereits 1925 Masahiroshi Ishibashi (36) neben zahlreichen Nebenprodukten meso- und racem-1,2-Diphenyläthylendiamin in geringen Ausbeuten herzustellen. I. Liefischitz und J. G. Bos (29) verbesserten eine von T. Japp und J. Moir (37) beschriebene Methode zur Herstellung von 1,2-Diphenyläthylendiaminen durch Reduktion von Isoamarin mit Natrium und Alkohol. In relativ guten Ausbeuten (44% d.Th.) erhielten Winaus und Adkins (38) racem-1,2-Diphenyläthylendiamin durch Reduktion von Benzildioxim mit Wasserstoff bei 100-150 at in Gegenwart eines Nickels-Kieselgur-Katalysators.

2.2.3.2. Darstellung

Diesen Darstellungsmethoden weit überlegen ist die von Vögtle und Goldschmitt (39) eingehend untersuchte Anwendung der bei Temperaturen oberhalb von 120°C eintretenden meso-d,l-Stereoisomerisierung der zweckmäßig gleichartig tetraarylsubstituierten doppelten Schiffbasen. Nicht nur der geringe Aufwand, sondern auch die erzielbaren hohen Ausbeuten machen dieses Verfahren zu dem günstigsten, das heute zur Verfügung steht.

In einem präparativen Ansatz (0,2 Mol) wurden in einer sechsstufigen Reaktion, ausgehend von 1,2-Di-(2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin und 4-Methoxybenzaldehyd je 0,06 Mol der beiden Diastereomeren 4 und 7 erhalten, das entspricht einer Ausbeute von 62% bezogen auf eingesetzten Benzaldehyd. Von Vorteil ist, daß die Zwischenverbindungen nicht gereinigt werden brauchen. Alle Umsetzungen wurden zweckmäßig in Acetonitril ausgeführt, dem Lösungsmittel, aus dem die Diimine auch umkristallisiert wurden. Die Zwischenstufen 4 und 6 fielen nahezu analysenrein an. Die Stereoisomerisierung und die Hydrolyse konnten in einem Reaktionsgefäß (als Eintopfreaktion) vorgenommen werden. Dabei wurde das meso-Diimin 6 auf etwa 200 - 220°C zur Schmelze erhitzt. Nach kurzem Abkühlen wurde mit 3N H₂SO₄ versetzt und das Hydrolysegemisch mit Wasserdampf destilliert. Im gleichen Reaktionsgefäß vollzog sich anschließend die Trennung der Diastereomeren. Das Sulfat des meso-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamins ist besser löslich als das Salz der Racemform. Meso-Diimin hydrolysiert schneller als die entsprechende Racemform. Die Wasserdampfdestillation wurde mehrmals unterbrochen, das nicht hydrolysierte racemische Diimin abfiltriert und erneut einer Wasserdampfdestillation unterworfen. In den ersten Fraktionen kristallisierte das Sulfat des meso-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin (4) in den späteren Fraktionen die entsprechende Racemform (7) aus. Beide Formen kristallisieren sehr rein als schwerlösliche 1:1 Salze (Sulfat). Nach Abtrennung des racemischen Sulfats konnte die meso-Verbindung mit Natronlauge in die freie Base übergeführt und durch wiederholte thermische Behandlung ihres Diimins schließlich weitgehend in das Diastereo-

mere, 6b, übergeführt werden.

Zu III:

2.2.4. Auftrennung von racem-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin in seine optischen Antipoden

2.2.4.1. Allgemeines

Feist und Arnstein (32) trennten racem-1,2-Diphenyläthylendiamin durch oftmalige fraktionierte Kristallisation der Ditartrate. Dieses langwierige und verlustreiche Verfahren wurde später von Liefischitz und Bos (29) wesentlich verbessert. Sie trennten die Substanz durch Kristallisation des (+) bzw. (-)-Monotartrats. Dieses Verfahren wurde in späteren Arbeiten (9) nochmals verbessert und die absolute Konfiguration des (-)-Diphenyläthylendiamins aufgeklärt (40).

2.2.4.2. Darstellung

Zur Darstellung von (+) und (-)-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin wurde das Racemat mit äquimolaren Mengen L(+)-Weinsäure versetzt und kurz erhitzt. Es kristallisierte das L(+)-Tartrat des (-)-Diamins aus, das nach einmaligem Umkristallisieren aus Wasser hinreichend rein war ($[\alpha]_{546}^{20} = -134,5^{\circ}$ $c = 1$ in Methanol als Base vermessen). Das (+)-Diamin konnte in analoger Weise gewonnen werden ($[\alpha]_{546}^{20} = +138,4^{\circ}$ $c = 1$ in Methanol als Base vermessen).

Zu IV:

2.2.5. Herstellung von (+) und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin

2.2.5.1. Versuche zur Herstellung durch Reduktion der doppelten Schiffschen Basen

Die Darstellung von Schiffschen Basen aus primären Aminen und Aldehyden ist unproblematisch und in der Literatur vielfach be-

schrieben. Die Herstellung von Doppelschiffbasen aus Diphenyl-äthylendiamin und Aldehyd oder Keton ist etwas problematisch. Bei Umsetzung von ADA mit aromatischen Aldehyden kommt es häufig, wie oben beschrieben, zu einer Diaza-Cope-Umlagerung. Doppelschiffbasen aus aliphatischen Ketonen und verzweigt-kettigen Aldehyden wurden von H. Staab (41) hergestellt. Doppelschiffbasen aus 1,2-Diphenyläthylendiaminen und geradkettigen aliphatischen Aldehyden sind in der Literatur noch nicht beschrieben. In analogen Versuchen zu (41) wurde versucht, die Doppelschiffbase aus 1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin und Butyraldehyd herzustellen. Dabei bildeten sich nur harzige Produkte, die chromatographisch ein Vielkomponentengemisch zeigten. Variation der Lösungsmittel der Temperatur, Auskochen des Wassers, brachten kein positives Ergebnis. Aus diesem Grunde wurde ein anderes Syntheseverfahren gewählt.

2.2.5.2. Darstellung von N,N'-Dibutyryl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin

Die Darstellung von N,N'-Dibutyryl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin gelang ohne Schwierigkeit durch Acylierung des primären Diamins mit einem leichten Überschuß an Butyrylchlorid in abs. Äther bei Anwesenheit von Triäthylamin. Das entstandene Diacylprodukt ist in Äther unlöslich und kann so von nicht verbrauchtem Butyrylchlorid getrennt werden. Auf eine Analyse des Produkts wurde verzichtet, und die Mischung aus N,N'-Dibutyryl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin und Triäthylamin zur Reduktion mit LiAlH_4 eingesetzt.

2.2.5.3. (+)- und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin

Die Reduktion der Diacylverbindungen gelang glatt und in sehr hohen Ausbeuten mit LiAlH_4 in absolutem Äther (42). Die NMR-Spektren der optischen Antipoden waren mit dem Spektrum des nach Verfahren D 1.4 gewonnenen Racemates identisch. Die optische Drehung der Antipoden wurde durch Messung der Dihydrochloride

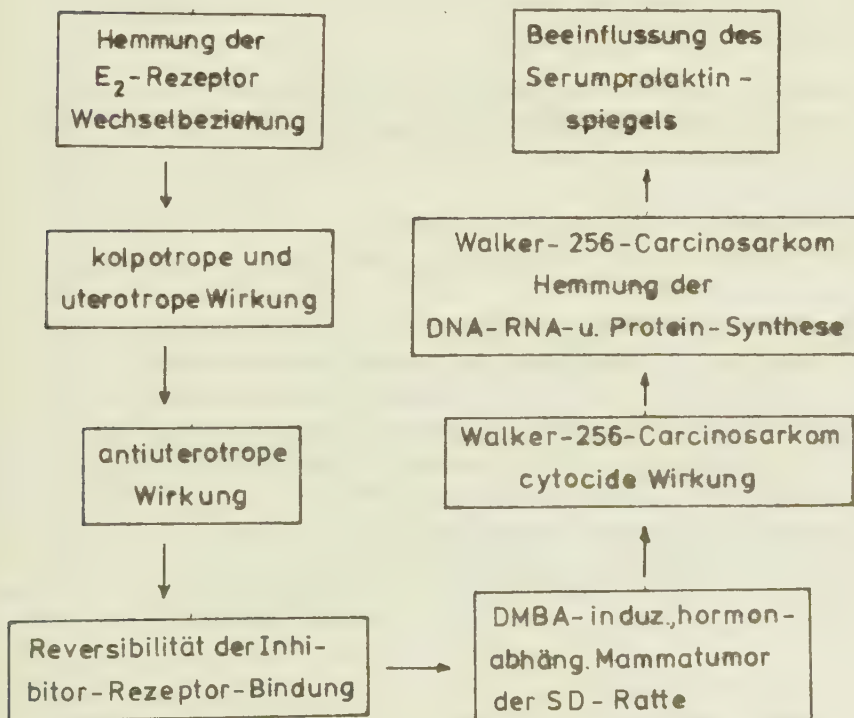
in Methanol bestimmt. Durch die N-Alkylierung trat eine Umkehrung des Drehsinns auf (D 2.70 $[\alpha]_{546}^{25} = -134,0^\circ$, daraus
 D 2.73 $[\alpha]_{546}^{25} = +46,2^\circ$; D 2.71 $[\alpha]_{546}^{25} = -138,4^\circ$ daraus
 D 2.72 $[\alpha]_{546}^{25} = -45,6^\circ$; $c = 1,0$ in Methanol.

Die Äther wurden analog zum Racemat nach Verfahren 1.13 in sehr guten Ausbeuten gespalten. Der Drehsinn veränderte sich im Vergleich zur Ätherverbindung nicht.

C. Pharmakologische Prüfung

1. Testsystem zur Prüfung mammatumorrhemmender Östrogen-Rezeptor-affiner Substanzen.

Zur Pharmakologischen Beurteilung der Verbindungen wurde ein Testsystem benutzt, das die Auffindung Östrogen-Rezeptor-affiner, östrogenen, antiöstrogenen, antitumoralen und Serum-Prolaktin beeinflussender Eigenschaften gestattet.



1.1. Hemmung der ^3H -Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung

Im ersten Test wird die Affinität der potentiellen mammatumorerhemmenden Substanzen zum Oestradiolrezeptor bestimmt. Maß für die Affinität ist die Fähigkeit, die ^3H -Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung zu inhibieren (Dextran Coated Charcoal-Methode, Rezeptorpräparation: Kalbsuteruscytosol, Auswertungsmethode: Lineweaver-Burk). Die Hemmkonstante (K_i) wird ermittelt, wenn die Substanz in einer Konzentration von 2×10^{-5} Mol die Bindung von 2×10^{-10} M ^3H -Oestradiol zum Rezeptor um mindestens 30% zu hemmen vermag. Eine Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung besagt, daß es sich bei der geprüften Substanz entweder um einen Agonisten (Oestrogen) oder um einen Antagonisten (Antiöstrogen) handelt.

In jedem Fall zeigt ein positives Ergebnis, daß die Substanz zu einer Anreicherung im Oestrogenrezeptor-haltigen Gewebe (also auch im Mammatumor) befähigt ist.

1.2. Testung auf östrogene Eigenschaften - kolpotrope und uterotrope Wirkung -

Zur Bestimmung einer möglichen agonistischen Wirkung wird der Allen Doisy-Test herangezogen. Bei einem positiven Ergebnis wird zur Bestimmung des Wirktyps und zur Quantifizierung der östrogenen Wirkung der Dorfman-Test durchgeführt, ein Test, bei dem die Uterustrockengewichte behandelter juveniler Mäuse mit denen einer Kontrollgruppe verglichen werden.

Durch diesen Test werden sowohl 'echte Oestrogene' als auch 'partielle' Oestrogene und 'impeded' Oestrogene erfaßt.

Oestradiolrezeptor-affine Substanzen können im Prinzip in 4 verschiedene Wirkungsgruppen eingeteilt werden:

- a) 'echte Oestrogene'
- b) 'partielle Oestrogene'
- c) 'impeded Oestrogene'
- d) 'echte Antiöstrogene'

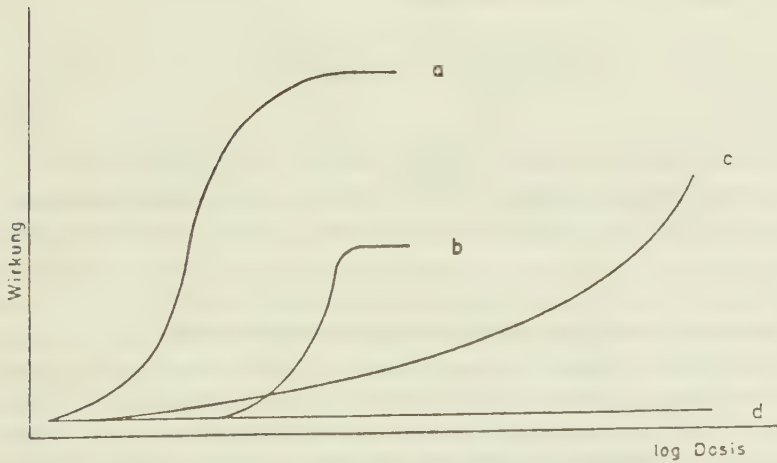


Abb. 6: Verlauf der Dosis-Wirkungskurven der Östrogenrezeptor-affinen Wirktypen a-d

'Echte Oestrogene' (z.B. Oestron, Diäthylstilböstrol, Hexöstrol) zeigen einen steilen Anstieg ihrer Dosis-Wirkungs-Kurven und bereits nach geringer Dosissteigerung Maximaleffekte. Die Dosis-Wirkungskurven 'partieller Oestrogene' (z.B. Nafoxidin) verlaufen anfangs steil, dann plateauartig. 'Partielle Oestrogene' erreichen auch in hohen Dosen nie die maximale Wirkung 'echter Oestrogene'. 'Impeded Oestrogene' (z.B. Oestriol) zeigen flach ansteigende Dosis-Wirkungs-Kurven und erreichen erst in sehr hohen Dosen die maximale Wirkung 'echter Oestrogene'. 'Echte Antiöstrogene' (z.B. MER-25) rufen keine östrogenen Eigenschaften hervor.

Eine weitere Prüfung gemäß Testsystem 1.2. wurde nur bei Substanzen vom Wirktyp b-d vorgenommen.

1.3. Testung auf antiöstrogene Eigenschaften

- antiuterotrope Wirkung -

Zum Nachweis antiöstrogener Effekte werden die Uterusgewichte von Tierkollektiven juveniler Mäuse verglichen, die mit Oestron (Kontrolle) bzw. mit Oestron und Substanz (Versuch) behandelt wurden.

1.4. Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung

In Untersuchungen unseres Arbeitskreises wurde festgestellt, daß Östrogene, antiöstrogene und mammatumorstemmende Effekte im Tierversuch nur bei Verbindungen zu erwarten sind, die eine geringe Reversibilität ihrer Bindung zum E_2 -Rezeptor aufweisen.

Die Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung wird bei in vitro-Experimenten in einem geschlossenen System festgestellt. Es ist denkbar, daß in einem offenen System, wie es der tierische Organismus darstellt, bei Verbindungen mit einer ausgeprägten Affinität zum E_2 -Rezeptor dann agonistische bzw. antagonistische Effekte fehlen, wenn eine starke Reversibilität ihrer Rezeptor-Bindung vorliegt. Auf diese Weise erklärt Terenius (52) die schwache agonistische bzw. antagonistische Wirkung des hoch

E_2 -Rezeptor-affinen meso-Butestrol. Wegen der Bedeutung der Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Wechselbeziehung für das Ausmaß der mammatumormhemmenden Wirkung wird in Anlehnung an die Methode von Rochefort und Capony (53) ein Reversibilitätsexperiment als 4. Beurteilungskriterium in das Testsystem aufgenommen.

1.5. DMBA-induzierter hormonabhängiger Mammatumor der SD-Ratte

Als 5. Beurteilungskriterium wird die Beeinflussung des DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammatumors der SD-Ratte herangezogen. Ein Rückgang oder eine Verzögerung des Tumorstwachstums ist dann zu erwarten, wenn die Substanz folgende Eigenschaften zeigt:

1. hohe E_2 -Rezeptoraffinität
2. geringe oder fehlende Östrogene Wirkung
3. hohe antiöstrogene Wirkung
4. geringe Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung

In früheren Untersuchungen (20, 54) mit N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiaminen wurde bei einigen Vertretern eine ausgeprägte Wirkung am DMBA-induzierten Mammacarcinom der Ratte festgestellt. Da die neuen Wirkstoffe keine Affinität zum E_2 -Rezeptor zeigen, wurde eine Bioaktivierung zu Antiöstrogenen, die OH-Gruppen in geeigneten Positionen in beiden aromatischen Ringen aufweisen, diskutiert.

Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit E_2 -Rezeptor-affine N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamine, auch wenn sie in vivo keine agonistischen oder antagonistischen Eigenschaften aufweisen, im Tierversuch am DMBA-induzierten Mammacarcinom der Ratte geprüft.

1.6. Walker-256-Carcinosarkom - cytocide Wirkung -

In Untersuchungen mit Diäthylstilböstrol und Hexöstrol, die in enger struktureller Beziehung zu N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiaminen stehen, wurde eine Hemmung der Nukleinsäure- und

Proteinbiosynthese bzw. in höheren Dosierungen eine cytocide Wirkung festgestellt. Es wurde eine Beteiligung dieser Effekte am Mechanismus der mammatumorerhemmenden Wirkung diskutiert (55, 56). Da mit solchen Eingriffen in den Stoffwechsel der Tumorzelle auch bei N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiaminen zu rechnen war, wurden analoge Untersuchungen durchgeführt. Als Kriterium diente die Beeinflussung des Einbaus von ^3H -Thymidin, ^3H -Uridin und ^3H -Leucin in die Zelle.

1.7. Beeinflussung des Serum-Prolaktinspiegels

Prolaktin spielt bei Entstehung und Wachstum des hormonabhängigen Mammatumors eine entscheidende Rolle (57, 62). Oestrogene (58, 59) und Prolaktin (59, 60) fördern die Entwicklung von Mammatumoren. Durch Absenken des Oestrogen-(Ovarektomie)- oder Prolaktinspiegels (Hypophysektomie) (61, 60) - wird das Tumorstadium gehemmt. Oestrogene haben bei hypophysektomierten Tieren keinen Einfluß auf Mammatumoren (63), Prolaktingaben fördern dagegen bei ovarektomierten Tieren die Mammatumorentwicklung (61). Clemens und Welsch (64, 65) bestätigen, daß Prolaktin ohne Mitwirkung von Oestrogenen das Tumorstadium für einige Zeit bei ovarektomierten und adrenaletomierten Tieren unterhält.

Der wachstumstimulierende Effekt von Oestrogenen auf das hormonabhängige Mammacarcinom beruht also weniger auf einer direkten Wirkung im Tumorgewebe, als auf einer Erhöhung der Prolaktinausschüttung. Die Prolaktinausschüttung wird von Oestrogenen durch 2 verschiedene Mechanismen ausgelöst:

1. Sie stimulieren im Hypophysenvorderlappen die Freisetzung von Prolaktin.
2. Sie bewirken zusätzlich eine verminderte PIF-Ausschüttung im Hypothalamus (67).

Antiöstrogene wie Nafoxidin wirken im umgekehrten Sinne und senken den Prolaktinspiegel (66). Ergot-Alkaloide wie Ergocornine und 2Br- α -Ergocryptin (CB-154) wirken tumorhemmend durch Erhöhung der PIF-Aktivität im Hypothalamus und durch Antagonisierung von Prolaktin im Mammatumor. Unabhängig vom Mecha-

nismus hemmt ein Absenken des Serumprolaktinspiegel in jedem Fall das Wachstum von hormonabhängigen Mammatumoren.

2. Versuchsergebnisse

2.1. Entwicklung Oestrogenrezeptor-affiner Verbindungen aus Hexöstrol: N-isostere Hexöstrole vom Typ der N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyl-äthylendiamine

2.1.1. Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_i) der Inhibitor- E_2 -Rezeptor-Komplexe

Von allen untersuchten N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiaminen sind nur racem-Formen zu einer Hemmung der E_2 -Rezeptor-Wechselbeziehung befähigt. Als weitere Voraussetzung für eine E_2 -Rezeptor-Wechselbeziehung gilt eine phenolische OH-Gruppe im Ring und eine N-Alkylkette von $C > C_2H_5$. Die Rezeptoraffinität der racem-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine nimmt in der Reihenfolge $4-OH \gg 3-OH \gg 2-OH$ stark ab, wobei die Verbindung Nr. 2.47a mit OH-Gruppe in 3-Stellung bereits so wenig affin ist, daß eine Dissoziationskonstante nicht bestimmt werden kann ($K_i > 10^{-4}$). Verbindung 2.46a mit OH-Gruppe in 2-Stellung zeigt keine Affinität zum E_2 -Rezeptor. Die Dissoziationskonstanten der N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine nehmen mit einer Alkylkettenlänge von C_2 bis C_4 zu, und über $C_5 - C_6$ wieder ab. Verzweigte N-Alkylketten bewirken eine Abnahme der Rezeptoraffinität. $C_2H_5 \ll i-C_3H_7 < C_3H_7 < C_4H_9 > C_5H_{11} > C_6H_{13}$. Monochlorierung an Aromaten führt zu einer Erhöhung der Rezeptoraffinität (N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin: $K_i > 10^{-4}$; N,N'-Dibutyl-1,2-di-(6'-chlor-3'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin: $K_i = 1,2 \times 10^{-6}$).

Alle untersuchten Substanzen hemmen die E_2 -Rezeptor-Wechselbeziehung kompetitiv.

Als Racemform mit der größten Rezeptoraffinität wurde Subst. Nr. 2.48a mit einem K_i von $2,75 \times 10^{-7}$ ermittelt.

Die Auftrennung in seine optischen Antipoden bringt eine wesentliche Steigerung der Rezeptoraffinität. Der (+)-Antipode kommt der von Geynet (68) ermittelten Rezeptoraffinität für Nafoxidin ($K_i = 2 \times 10^{-8}$) sehr nahe. Sein K_i -Wert beträgt $4,79 \times 10^{-8}$.

Der K_i -Wert des (-)-Antipoden liegt 2 Zehnerpotenzen niedriger ($1,43 \times 10^{-6}$). Der Ringschluß von Subst. Nr. 3.48a mit Formaldehyd zum trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin (Subst. Nr. 2.62) führt ebenfalls zu einer erheblichen Verbesserung des K_i -Wertes ($8,5 \times 10^{-8}$). Die rezeptoraffinste Substanz in dieser Reihe ist (+)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin, Subst. Nr. 2.75.

Tabelle 6: In vitro-Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin (Nr. D 2.65), Nafoxidin und racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(6'-chlor-3'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Nr. D 2.44a)

Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i)
und des ^3H -Oestradiol-Rezeptorkomplexes (K_d)

Auswertung: nach Lineweaver-Burk

Rezeptorquelle: Kalbsuterus

Inkubationszeit: 20 Stunden bei 0°C

Verb.Nr.	2.65	Nafoxidin	2.44a
$K_i \pm V^+ \text{ M}$	$8,5 \pm 0,01 \times 10^{-8}$	$1,2 \pm 0,5 \times 10^{-8}$	$1,2 \pm 0,1 \times 10^{-6}$
$K_d \pm V^+ \text{ M}$	$10,6 \pm 0,01 \times 10^{-10}$	$1,5 \pm 0,7 \times 10^{-10}$	$1,5 \pm 0,25 \times 10^{-10}$
Regressions- gerade ohne Inhibitor ⁺⁺	$y = 1,58x + 5,46$	$y = 0,25x + 16,85$	$y = 0,25x + 16,85$
Korrelat.- koeffizient	0,988	0,991	0,988
Anzahl der Wertepaare	20	20	16
Regressions- gerade mit Inhibitor ⁺⁺	$y = 2,77x + 6,61$	$y = 4,61x + 10,11$	$y = 4,46x + 19,48$
Korrelat.- koeffizient	0,993	0,991	0,994
Anzahl der Wertepaare	20	20	12
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	8	4,0	4,0
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	1144	741	741

⁺: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

⁺⁺: $X = \frac{1}{\text{freies Oestradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$; $Y = \frac{1}{\text{gebundenes Oestradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

Tabelle 7:

In vitro-Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylen-diamin (Nr. D 2.48a), (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylen-diamin (Nr. D 2.74) und (+)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylen-diamin (Nr. D 2.75)

Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i) und des ^3H -Oestradiol-Rezeptorkomplexes (K_d)

Auswertung:

nach Lineweaver-Burk

Rezeptorquelle:

Kalbsuterus

Inkubationszeit:

20 Stunden bei 0°C

Verb.Nr.	2.48 a	2.74	2.75
$K_i \pm V^+ M$	$2,75 \pm 0,01 \times 10^{-7}$	$1,43 \pm 0,01 \times 10^{-6}$	$4,79 \pm 0,01 \times 10^{-8}$
$K_d \pm V^+ M$	$3,19 \pm 0,02 \times 10^{-10}$	$3,19 \pm 0,0028 \times 10^{-10}$	$8,01 \pm 0,1 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade ohne Inhibitor ⁺⁺	$y = 0,43x + 13,61$	$y = 0,43x + 13,61$	$y = 0,68x + 8,53$
Korrelat.-koeffizient	0,958	0,95	0,988
Anzahl der Wertepaare	30	30	18
Regressionsgerade mit Inhibitor ⁺⁺	$y = 4,75x + 17,99$	$y = 1,19x + 15,59$	$y = 2,79x + 6,75$
Korrelat.-koeffizient	0,793	0,72	0,983
Anzahl der Wertepaare	25	30	15
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	7,5	7,5	7
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	489	489	860

+: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)
$$++: X = \frac{1}{\text{freies Oestradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right); \quad Y = \frac{1}{\text{gebundenes Oestradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$$

Tabelle 8: In vitro-Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Dipentyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylen-diamin (Nr. D 2.61) und racem-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Nr. D 2.63)
Dissoziationskonstanten der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i) und und des ^3H -Oestradiol-Rezeptorkomplexes (K_d)

Auswertung: nach Lineweaver-Burk

Rezeptorquelle: Kalbsuterus

Inkubationszeit: 20 Stunden bei 0°C

Verb.Nr.	2.61	2.63
$K_i \pm V^+ \text{ M}$	$4,58 \pm 0,005 \times 10^{-10}$	$5,11 \pm 0,005 \times 10^{-10}$
$K_d \pm V^+ \text{ M}$	$5,2 \pm 0,028 \times 10^{-10}$	$7,55 \pm 0,01 \times 10^{-10}$
Regressions- gerade ohne Inhibitor ⁺⁺	$y = 0,45x + 1,18$	$y = 0,4x + 1,18$
Korrelat.- koeffizient	0,998	0,998
Anzahl der Wertepaare	15	15
Regressions- gerade mit Inhibitor ⁺⁺	$y = 1,28x + 1,18$	$y = 1,2x + 1,18$
Korrelat.- koeffizient	0,968	0,998
Anzahl der Wertepaare	15	15
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	0,8	0,8
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	1000	1000

⁺: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

⁺⁺: $x = \frac{1}{\text{freies Oestradiol}} \left(\frac{1}{\text{M}} \times 10^8 \right); \quad y = \frac{1}{\text{gebundenes Oestradiol}} \left(\frac{1}{\text{M}} \times 10^8 \right)$

Tabelle 9: In vitro-Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Diisopropyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Nr. D 2.59) und racem-N,N'-Di-n-propyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Nr. D 2.57)
Dissoziationskonstante der Hemmstoff-Rezeptorkomplexe (K_i) und des ^3H -Oestradiol-Rezeptorkomplexes (K_d)

Auswertung: nach Lineweaver-Burk

Rezeptorquelle: Kalbsuterus

Inkubationszeit: 20 Stunden bei 0°C

Verb.Nr.	2.59	2.57
$K_i \pm V^+ \text{ M}$	$6,99 \pm 0,004 \times 10^{-6}$	$8,63 \pm 0,03 \times 10^{-7}$
$K_d \pm V^+ \text{ M}$	$7,55 \pm 0,01 \times 10^{-10}$	$7,55 \pm 0,01 \times 10^{-10}$
Regressionsgerade ohne Inhibitor ⁺⁺	$y = 0,67 x + 8,94$	$y = 0,67x + 8,93$
Korrelat.-koeffizient	0,988	0,98
Anzahl der Wertepaare	18	18
Regressionsgerade mit Inhibitor ⁺⁺	$y = 2,77x + 9,53$	$y = 8,58x + 4,71$
Korrelat.-koeffizient	0,994	0,98
Anzahl der Wertepaare	15	15
Proteingehalt des Cytosols (mg/ml)	7	7
Rezeptorgehalt (fMol/mg Protein)	799	860

⁺: V = Vertrauensbereich ($\alpha = 0,05$)

⁺⁺: $x = \frac{1}{\text{freies Oestradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$; $y = \frac{1}{\text{gebundenes Oestradiol}} \left(\frac{1}{M} \times 10^8 \right)$

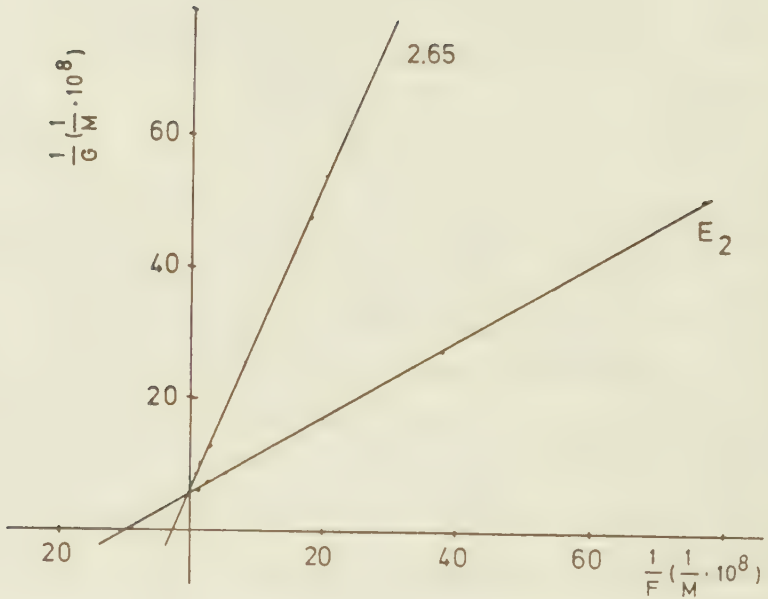


Abb. 1: Kompetitive Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch trans-1,3-Dibutyl-3,4-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin; Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Oestradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: 2×10^{-7} Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Oestradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Oestradiol}}$

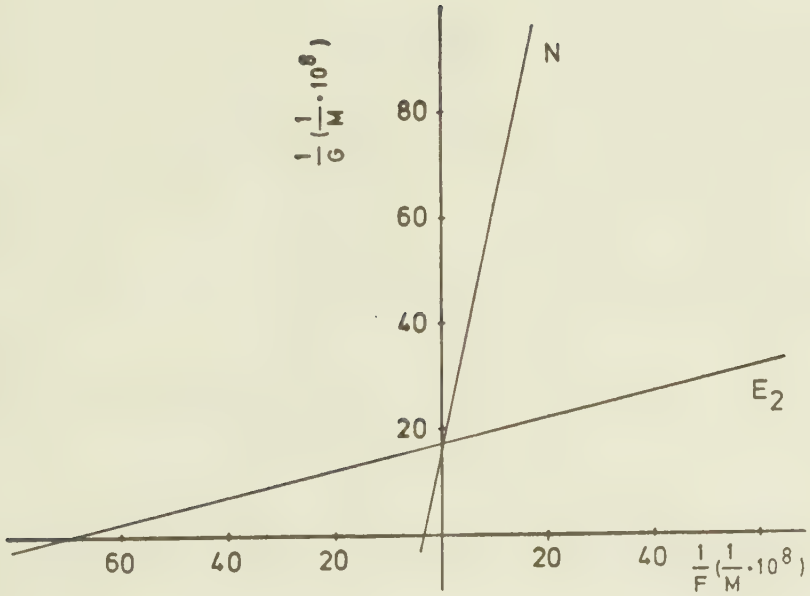
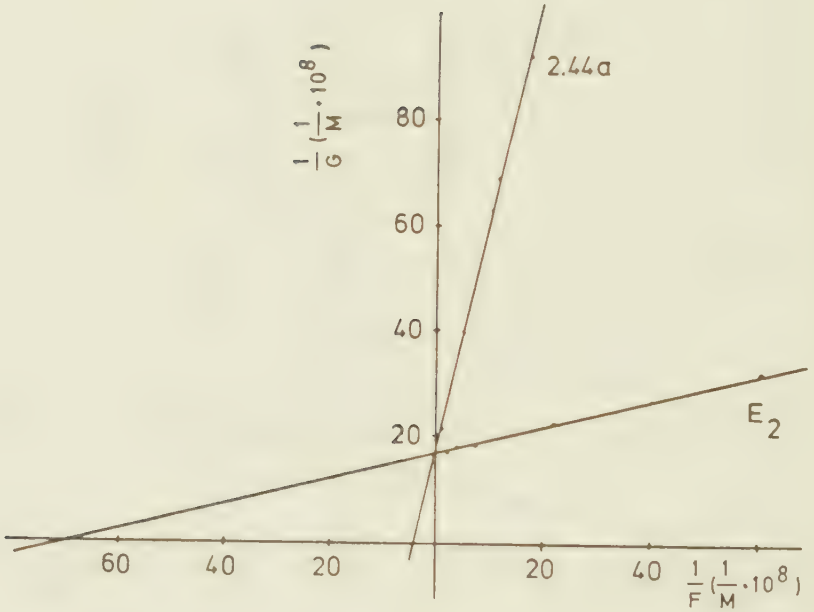


Abb. 8: Kompetitive Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch Nafoxidin (N);
 Lineweaver-Burk-System;
 Substrat: ^3H -Oestradiol (E_2);
 Rezeptorquelle: Kalbsuterus;
 Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;
 Hemmstoffkonzentration: $2,0 \times 10^{-7}$ Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Oestradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Oestradiol}}$



Ausg. 1: Kompetitive Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung
durch N,N'-Dibutyl-1,2-di-(6'-chlor-3'-hydroxyphenyl)-äthylen-
diamin

Lineweaver-Burk-System

Substrat: ^3H -Oestradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: 2×10^{-5} Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Oestradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Oestradiol}}$

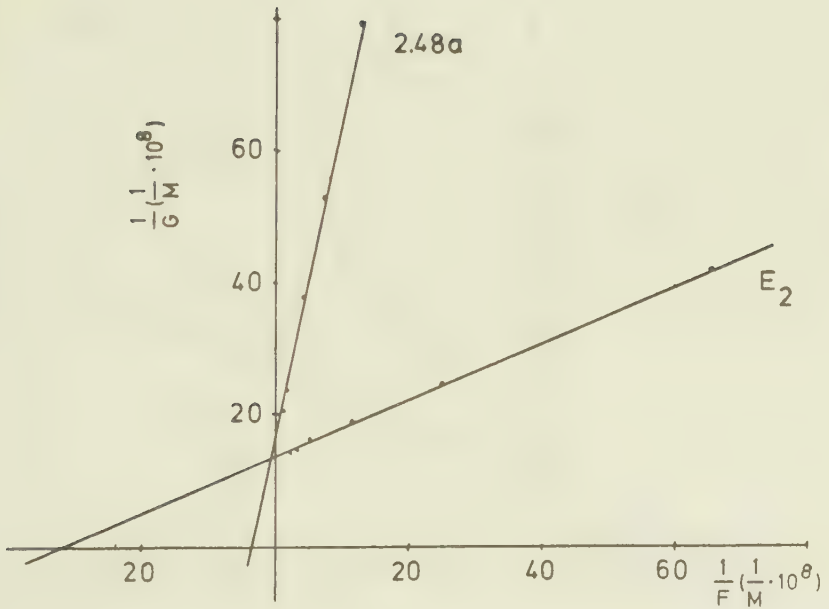


Abb. 10: Kompetitive Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Oestradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;

Hemmstoffkonzentration: 2×10^{-6} Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Oestradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Oestradiol}}$

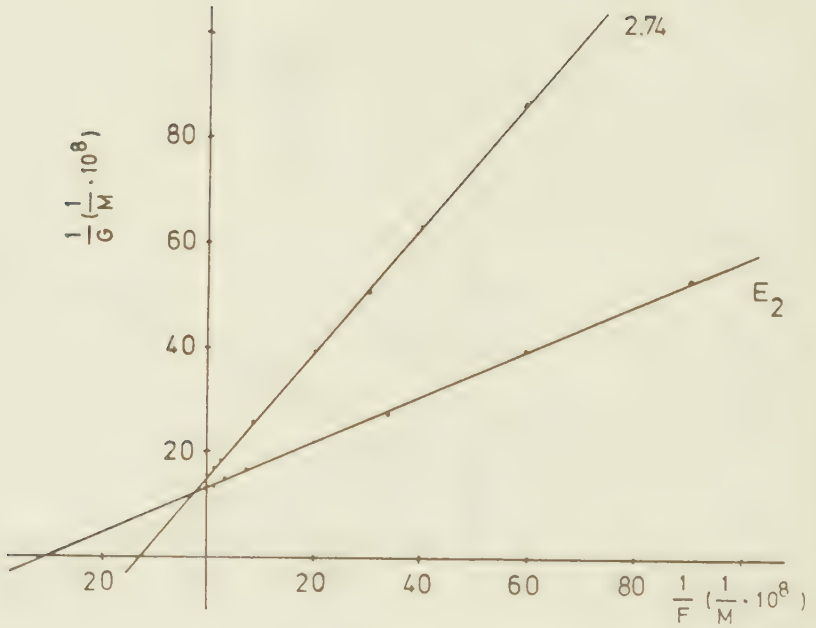


Abb. 11: Kompetitive Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch
(-) -N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Oestradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C;

Hemmstoffkonzentration: 2×10^{-6} Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Oestradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Oestradiol}}$

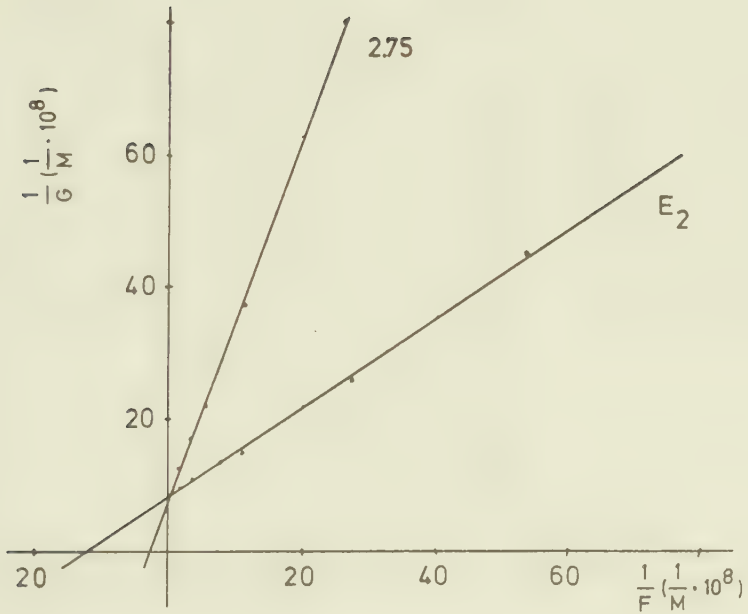


Abb. 12: Kompetitive Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung
 durch (+)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin
 Lineweaver-Burk-System;
 Substrat: ^3H -Oestradiol;
 Rezeptorquelle: Kalbsuterus;
 Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C ;
 Hemmstoffkonzentration: 2×10^{-7} Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Oestradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Oestradiol}}$

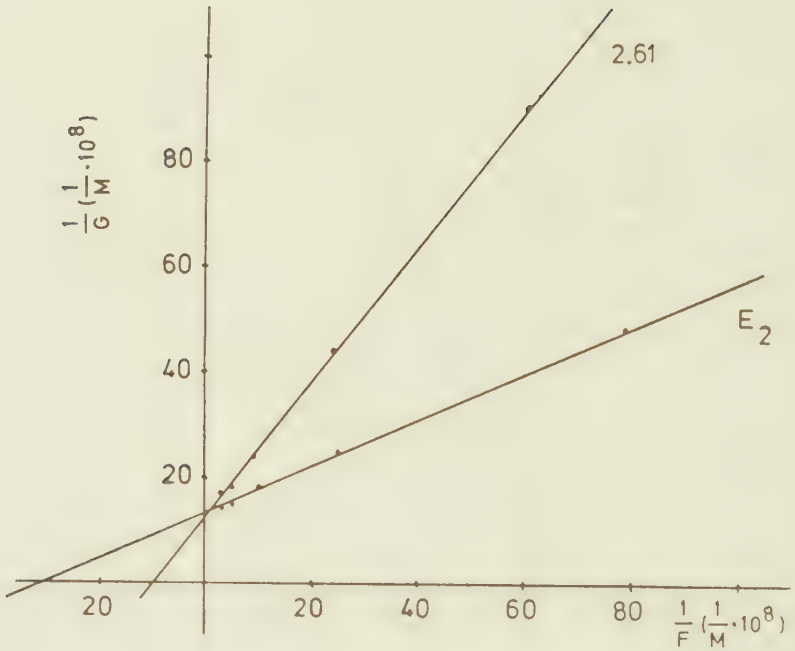


Abb. 13: Kompetitive Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Dipentyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Oestradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C;

Hemmstoffkonzentration: 2×10^{-6} Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Oestradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Oestradiol}}$

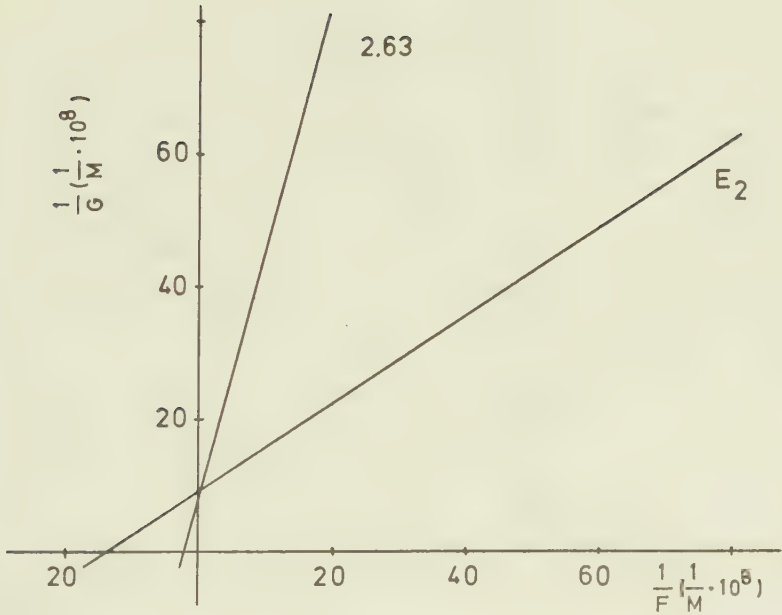


Abb. 14: Kompetitive Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin
 Lineweaver-Burk-System;
 Substrat: ^3H -Oestradiol (E_2);
 Rezeptorquelle: Kalbsuterus;
 Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C;
 Hemmstoffkonzentration: 2×10^{-5} Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Oestradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Oestradiol}}$

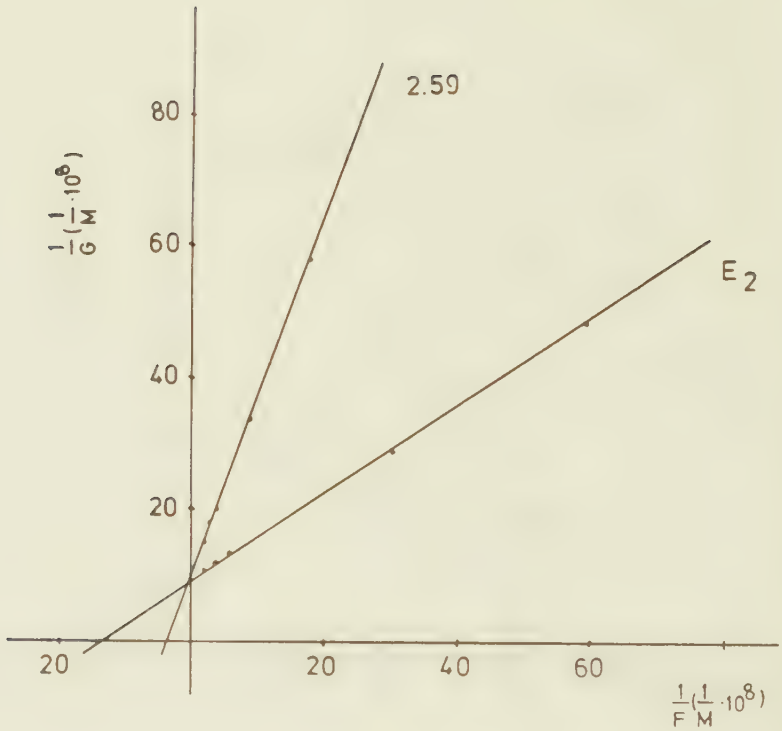


Abb. 15: Kompetitive Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Diisopropyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylen-diamin

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Oestradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus;

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C;

Hemmstoffkonzentration: 2×10^{-5} Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Oestradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Oestradiol}}$

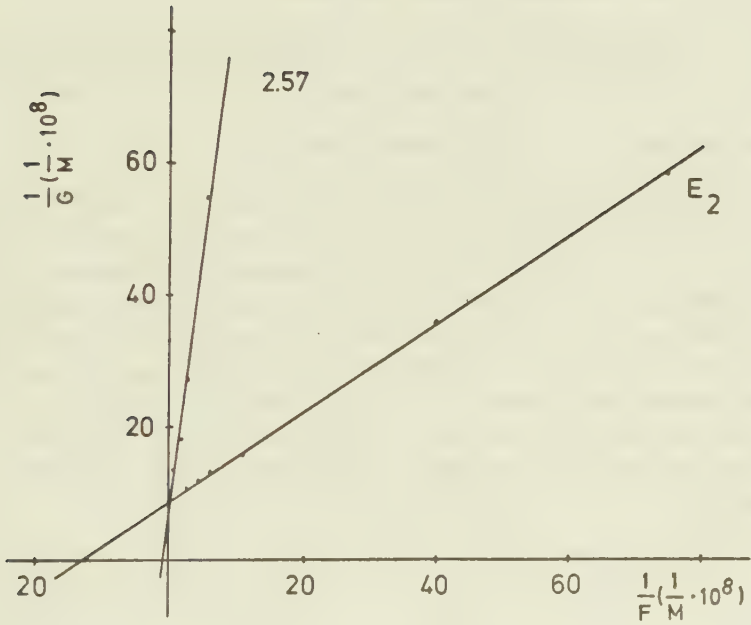


Abb. 16: Kompetitive Hemmung der Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung durch racem-N,N'-Di-n-propyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylen-diamin

Lineweaver-Burk-System;

Substrat: ^3H -Oestradiol (E_2);

Rezeptorquelle: Kalbsuterus

Inkubationsdauer: 20 h bei 0°C;

Hemmstoffkonzentration: 2×10^{-5} Mol/l

Abszisse: $\frac{1}{\text{freies } ^3\text{H-Oestradiol}}$

Ordinate: $\frac{1}{\text{gebundenes } ^3\text{H-Oestradiol}}$

2.1.2. Bestimmung der östrogenen Eigenschaften, - uterotrope und kolpotrope Wirkung -, der N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine

Die Bestimmung der uterotropen und kolpotropen Eigenschaften erfolgte mit Hilfe des Dorfman- und des Allen Doisy-Tests.

Zur Methodik siehe 'Experimenteller Teil' 4.2. und 4.4. .

In den vaginalen Abstrichen der mit den homologen racem-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiaminen und mit trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin behandelten, ovariectomierten Mäusen befanden sich auch in der höchsten Substanzdosierung fast ausschließlich Leukozyten, Schleim und kleine polygonale kernhaltige Zellen (Diöstrus), was auf ein Fehlen östrogenen Eigenschaften schließen läßt. Zur Erhärtung des Ergebnisses wurde am Beispiel von Substanz 2.48a und 2.48b ein Test auf uterotrope Wirkung durchgeführt, der ebenfalls negativ verlief.

Tabelle 10: Uterotroper und kolpotroper Test:

Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte juveniler Mäuse bei subcutaner Gabe von meso und racem N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (2.48 a, b)

Verb. Nr.	Dosis* µg	Tier- zahl	Körpergewicht g	uterotrope Wirkung **	kolpotrope Wirkung ***
0	0	7	14,0 $\pm$ 1,3	10,8 $\pm$ 0,9	0
2.48a	30	7	14,2 $\pm$ 1,8	11,2 $\pm$ 2,0	x
	120	7	14,0 $\pm$ 1,2	10,5 $\pm$ 1,8	0
	240	7	13,5 $\pm$ 1,6	10,9 $\pm$ 2,8	0
	480	7	13,3 $\pm$ 1,0	11,9 $\pm$ 1,4	0
	1920	7	14,5 $\pm$ 2,0	10,3 $\pm$ 2,2	0
2.48b	30	7	15,9 $\pm$ 2,0	11,6 $\pm$ 1,1	0
	120	7	15,7 $\pm$ 1,8	10,8 $\pm$ 1,3	0
	240	7	15,3 $\pm$ 1,7	10,8 $\pm$ 1,6	x
	480	7	15,9 $\pm$ 1,6	10,6 $\pm$ 1,4	0
	1920	7	14,8 $\pm$ 1,4	11,0 $\pm$ 1,0	0

* : Gesamtdosis pro Tier und Versuch; Dosis wurde zur Aktivitäts-Berechnung verwendet.

** : $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

*** : Klassifizierung siehe Methodik

2.1.3. Bestimmung der antiöstrogenen Eigenschaften
- antiuterotrope Wirkung - der N,N'-Dialkyl-1,2-di-
(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine

Die Prüfung auf antiöstrogene Eigenschaften wurde bei zwei hoch affinen Substanzen (Nr. 2.48a; 2.75) und einer weniger affinen Substanz durchgeführt (Nr. 2.36).

Keine der untersuchten Verbindungen hemmte das Uteruswachstum juveniler, mit Oestron stimulierter Mäuse. - Dorfman-Test -. Methodik siehe 'Experimenteller Teil'.

Tabelle 11: Hemmung des mit Östron stimulierten Uteruswachstums juveniler Mäuse durch racem-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 2.63)

Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte bei subcutaner Applikation.

Verb. Nr.	Dosis* µg	Tierzahl	Körpergewicht g	Wirkung**	%-Hemmung***
0	0	8	14,2 ± 2,0	10,8 ± 1,0	-
Östron	0,32	8	14,0 ± 1,9	42,4 ± 5,0	-
2.36	30	8	13,8 ± 2,4	41,8 ± 4,2	-
	120	8	14,4 ± 1,8	42,8 ± 4,8	-
	240	8	13,8 ± 1,8	43,8 ± 6,0	-
	480	8	13,6 ± 1,4	42,2 ± 5,1	-

* : Gesamtdosis pro Tier und Versuch

** : $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

*** : $\% \text{-Hemmung} = 100 - \frac{(W_{S,T} - W_O)}{(W_S - W_O)} \times 100$

W_S : Wirkung Östron-Standard

$W_{S,T}$: Wirkung des Standards bei gleichzeitiger Gabe von
Testsubstanz

W_O : Wirkung des Lösungsmittels (0-Wert)

Tabelle 12: Hemmung des mit Östron stimulierten Uteruswachstums juveniler Mäuse durch racem- und (+)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 2.48a und 2.75).

Mittelwerte und Standardabweichungen der Wirkungsparameter und der Körpergewichte bei subcutaner Applikation.

Verb. Nr.	Dosis* μg	Tierzahl	Körpergewicht	Wirkung**	-Hemmung***
0	0	8	$12,8 \pm 1,6$	$11,8 \pm 1,2$	-
Östron	0,32	8	$13,1 \pm 1,4$	$8,2 \pm 4,8$	-
2.48a	30	8	$12,8 \pm 1,2$	$4,2 \pm 4,4$	-
	120	8	$13,8 \pm 1,7$	$2,1 \pm 4,6$	-
	140	8	$12,8 \pm 1,6$	$4,8 \pm 4,2$	-
	480	8	$13,2 \pm 1,1$	$3,8 \pm 4,4$	-
2.75	30	8	$13,2 \pm 1,6$	$13,2 \pm 3,2$	-
	120	8	$13,4 \pm 1,6$	$8,2 \pm 4,8$	-
	140	8	$12,8 \pm 1,7$	$11,2 \pm 3,0$	-
	480	8	$12,9 \pm 1,8$	$13,8 \pm 3,8$	-

* : Gesamtdosis pro Tier und Versuch

** : $\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$

*** : $\% \text{-Hemmung} = 100 - \frac{W_{S,T} - W_O}{W_S - W_O} \times 100$

W_S : Wirkung Östron-Standard

$W_{S,T}$: Wirkung des Standards bei gleichzeitiger Gabe von Östron

W_O : Wirkung des Lösungsmittels (0-Wert)

2.1.4. Bestimmung der Reversibilität der Rezeptorbindung von homologem racem-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine und trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin.

Um die Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung der homologen racem-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine zu bestimmen, wurde ein 'hot chase-Experiment' nach Rochefort und Capony (53) unter Verwendung von Cytosolen aus Kalbsuterus durchgeführt.

Methode: siehe 'Experimenteller Teil'

Alle Substanzen wurden in einer Konzentration von 2×10^{-5} M getestet.

Die K_i -Werte der homologen N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine sind zwar deutlich von der Länge und dem Verzweigungsgrad der N-Alkylkette abhängig, im 'hot chase-Experiment' kommen diese Unterschiede jedoch nicht mehr zur Geltung. Die Rezeptorbindung aller N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine ist in hohem Maße reversibel (80 - 90%). Es sind zwar graduelle Unterschiede bei der Reversibilität erkennbar, doch sind diese Unterschiede nicht signifikant. Erwartungsgemäß ist Subst. Nr. 275 mit dem kleinsten K_i -Wert am wenigsten reversibel.

Alle untersuchten Verbindungen mit OH-Gruppen in 4-Stellung sind (vermutlich) im gleichen Maße zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit Akzeptorgruppen im Rezeptorareal befähigt. Die Abnahme der K_i -Werte mit steigender N-Alkylkettenlänge ist mit einem Anstieg der hydrophoben Bindungskräfte erklärbar. Sie werden pro CH_2 -Glieder mit 650 cal/Mol veranschlagt. Auf eine sterische Hinderung bei Verbindungen mit Alkylketten $>\text{C}_4$ beruht vermutlich die Zunahme der K_i -Werte. Die hydrophoben Wechselbeziehungen sind so schwach ausgeprägt, daß bei der Behandlung mit Temperatur im 'hot chase-Experiment' die graduellen Unterschiede nicht mehr zum Tragen kommen und alle Verbindungen annähernd gleich hoch reversibel sind.

Der Einfluß von sterischen Effekten auf den K_i -Wert und die Ni-

vellierung dieser Effekte durch Temperaturbehandlung wird durch vergleichende Untersuchungen von (+)-, (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Subst. Nr. 2.75 und 2.74) und trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin (Subst. Nr. 2.65) gezeigt.

Trotz unterschiedlicher K_i -Werte sind alle Verbindungen annähernd gleich reversibel.

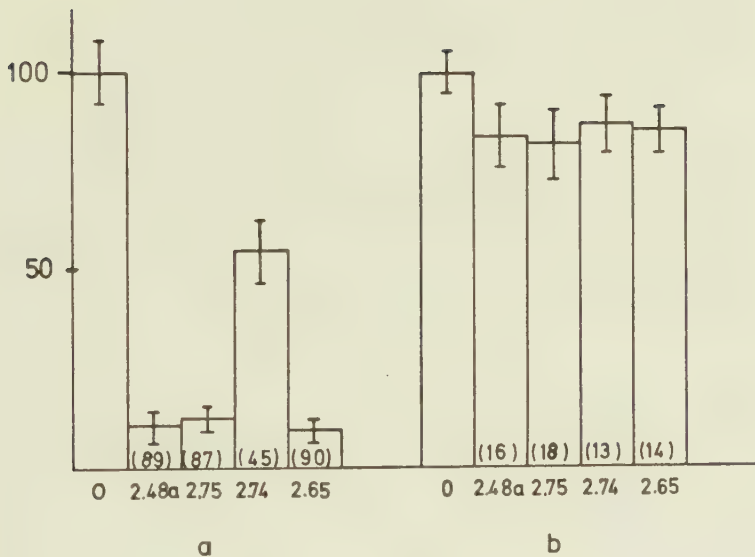


Abb. 17: Reversibilität der Rezeptor-Bindung von racem-(+)- und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin bzw. trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin (Subst. Nr. 2.48a, 2.75, 2.74, 2.65)

Rezeptorquelle: Kalbsuterus; O: Kontrolle; $^3\text{H-E}_2$: ^3H -Östradiol;
 I: Inhibitor; I-Konzentration: 2×10^{-5} M; $^3\text{H-E}_2$ -Konzentration:
 1×10^{-9} ; (): %-Anteil I-Rezeptor-Komplex

a. α . I 60 min 0°C

β . $^3\text{H-E}_2$ 145 min 0°C

b. α . I 60 min 0°C

β . Entfernung des ungeb. I

δ . $^3\text{H-E}_2$ 60 min 0°C, 25 min 25°C, 60 min 0°C;

Abszisse: Nummern der Verbindungen

Ordinate: %-Anteil Östradiol-Rezeptor-Komplex

Die %-Angaben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen mit je 3 Werten pro Hemmstoffkonzentration.

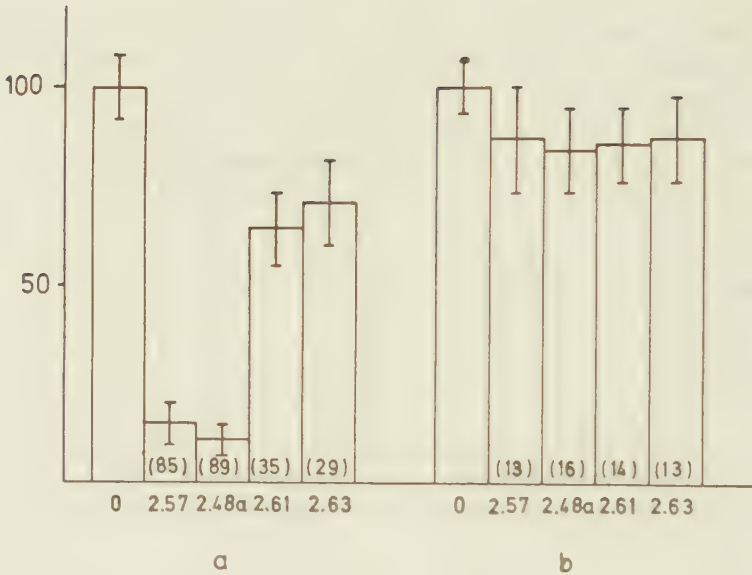


Abb. 18: Reversibilität der Rezeptor-Bindung von racem-N,N'-Dipropyl-, Dibutyl-, Dipentyl- und Dihexyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Subst. Nr. 2.57, 2.48a, 2.61, 2.63)

Rezeptorquelle: Kalbsuterus; 0: Kontrolle; $^3\text{H-E}_2$: $^3\text{H-Östradiol}$;
 I: Inhibitor; I-Konzentration: $2 \times 10^{-5} \text{ M}$; $^3\text{H-E}_2$ -Konzentration:
 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$; (): %-Anteil I-Rezeptor-Komplex;

a. α . I 60 min 0°C

B. $^3\text{H-E}_2$ 145 min 0°C

b. α . I 60 min 0°C

B. Entfernung des ungeb. I

δ . $^3\text{H-E}_2$ 60 min 0°C , 25 min 25°C , 60 min 0°C ;

Abszisse: Nummern der Verbindungen

Ordinate: %-Anteil Östradiol-Rezeptor-Komplex

Die %-Angaben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus zwei unabhängigen Versuchen mit je 3 Werten pro Hemmstoffkonzentration.

2.1.5. Hemmung des DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinoms der SD-Ratte durch N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine bzw. trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin.

Eine Auswahl von N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiaminen (Subst. Nr. 2.48a, 2.48b, 2.63, 2.74, 2.65) wurde einer eingehenden Prüfung am DMBA-induzierten Mammacarcinom der Ratte unterzogen. Alle Substanzen wurden in einem Dosisbereich von 15-25 mg/kg getestet. Es wurde jeweils die höchste Dosis gewählt, bei der es noch zu keiner signifikanten Abnahme des Tiergewichts während des Versuchs kam.

Ausführliche Angaben zur Versuchsdurchführung und zur Datenerfassung siehe 'Experimenteller Teil'.

Racem- (-)- und (+)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin hemmen ebenso wie racem-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin das Wachstum des DMBA-induzierten Mammatumors signifikant ($p < 0,1$ bzw. $< 0,05$). Die Hemmung von trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin konnte statistisch nicht abgesichert werden ($p > 0,05$).

Die Variation der Applikationsart bei racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin brachte bei intraperitonealer bzw. subcutaner Anwendung keine Unterschiede bei den tumorhemmenden Effekten.

Meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin steigerte im Vergleich zur Kontrolle das Tumorstadium ($p > 0,05$, nicht signifikant).

Ergebnisse:

Erzeugung des DMBA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte durch racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin, Verb.Nr. 2.48a

Therapiedauer: 28 Tage;

Applikation: Montag, Mittwoch, Freitag 15 mg/kg KG ip / sc

Vers. Nr.	Tumor- zahl	Tumor- zahl	W i r k u n g						Tumorf- flächenän- derung *	T/C
			VH	TH	KH	NT	Tierge- wichtsän- derung **			
			3	2	2	2	%	Z	%	
Kontroll- gr.	11	10	-	1	5	19	95	8	40	-
1. Dose i.p.	9	10	1	5	18	12	75	2	12,5	0,36
2. Dose i.p.	9	11	2	17	2	8	66	1	8,5	0,39

VH: völlige Tumorrückbildung

TH: teilweise Tumorrückbildung

KH: keine Hemmung des Tumorwachstums

NT: während der Therapie neu aufgetretene Tumoren

T: Anzahl der beeinflussten bzw. nicht beeinflussten Tumoren

T*: Tumorfächenänderung der Therapietiere am letzten Versuchstag

T**: Tumorfächenänderung der Kontrolltiere am letzten Versuchstag

*: Mittelwert am 28. Versuchstag

** : nach einer Woche Therapie

+: signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$)

***: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,05$)

****: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,01$)

Tabelle 14:

Hemmung des DMEA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte durch (+)- und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin, Verb.Nr. 2.74, 2.75

Therapiedauer: 28 Tage;

Applikation: Montag, Mittwoch, Freitag: 20 mg/kg KG i.p.

Verb. Nr.	Tier- zahl	Tumor- zahl 100%	W i r k u n g								% -Tierge- gewichtsan- derung**	% -Tumor- flächen- änderung*	T/C
			VH		TH		KH		NT				
			Z	%	Z	%	Z	%	Z	%			
Kontr.	12	22	-	-	4	18	82	7	32		+ 2,4	335	-
2.74	10	20	1	5	6	30	13	65	2	10	- 0,9***	112 ⁺	0,33
2.75	10	22	3	14	8	36	11	50	5	22	- 2,4****	115 ⁺	0,34

VH: völlige Tumorrückbildung
 TH: teilweise Tumorrückbildung
 KH: keine Hemmung des Tumorstadiums
 NT: während der Therapie neu aufgetretene Tumoren
 Z: Anzahl der beeinflussten bzw. nicht beeinflussten Tumoren
 T/C: % Tumorfächenänderung der Kontrolliere am letzten Versuchstag
 *: Tumorfächenänderung der Kontrolliere am letzten Versuchstag
 *: Mittelwert am 28. Versuchstag
 **: nach einer Woche Therapie
 +: signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$)
 ***: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,01$)
 ++++: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,2$)

Tab. 1:

Studium des DMBA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte durch racem-N,N'-Dihexyl-1,2-di(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin, Verb.Nr. 2.63
Therapiedauer: 21 Tage;

Ankulation: Montag, Mittwoch, Freitag: 25 mg/kg KG sc

Tier- Nr.	Tier- zahl	Tumor- zahl	Wirkung						%Tumorf- flächenan- derung *	%Tierge- wichtsän- derung **	T/C
			Z	W	TH	Z	PH	NT			
Kontl.	10	10	-	-	12	14	14	3	19	+ 2	-
2.63	11	11	2	14	42,5	14	64,5	11	33,3	+ 0***	0,38

W: völlige Tumorrückbildung
TH: teilweise Tumorrückbildung
KH: keine Hemmung des Tumorstwachstums
Z: während der Therapie neu aufgetretene Tumoren
T/C: Anzahl der beeinflussten bzw. nicht beeinflussten Tumoren
% Tumorfächenänderung der Therapietiere am letzten Versuchstag
% Tumorfächenänderung der Kontrolltiere am letzten Versuchstag
Mittelwert am 21. Versuchstag
*: nach einer Woche Therapie
**: signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,1$)
***: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,05$)

Tabelle 16:

Hemmung des DMBA-induzierten Mammatumors der SD-Ratte durch trans-1,2-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin, Verb.Nr. 2.65 und 2.48b

Therapiedauer: 28 Tage;

Ankulation: Montag, Mittwoch, Freitag 15 mg/kg KG sc

Verb. Nr.	Tier- zahl	Tumor- zahl 100%	W i r k u n g								% -Tumor- flächen- änderung *	T/C	
			VH		TH		KH		NT				
			Z	%	Z	%	Z	%	Z	%			
Kontr.	10	18	1	5,6	3	16,7	14	77,7	2	11,1	+ 1,8	315,9	-
2.65	8	10	0	0	3	30	7	70	0	0	+ 0,5***	104,9***	0,33
2.48 b	10	22	0	0	3	13,6	19	86,3	6	27	+1,7***	471,5***	1,49

VH: völlige Tumorrückbildung

TH: teilweise Tumorrückbildung

KH: keine Hemmung des Tumorstums

NT: während der Therapie neu aufgetretene Tumoren

Z: Anzahl der beeinflussten bzw. nicht beeinflussten Tumoren

T/C: % Tumorflächenänderung der Therapietiere am letzten Versuchstag

*: % Tumorflächenänderung der Kontrolltiere am letzten Versuchstag

***: Mittelwert am 28. Versuchstag

****: nach einer Woche Therapie

****: kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p > 0,05$)

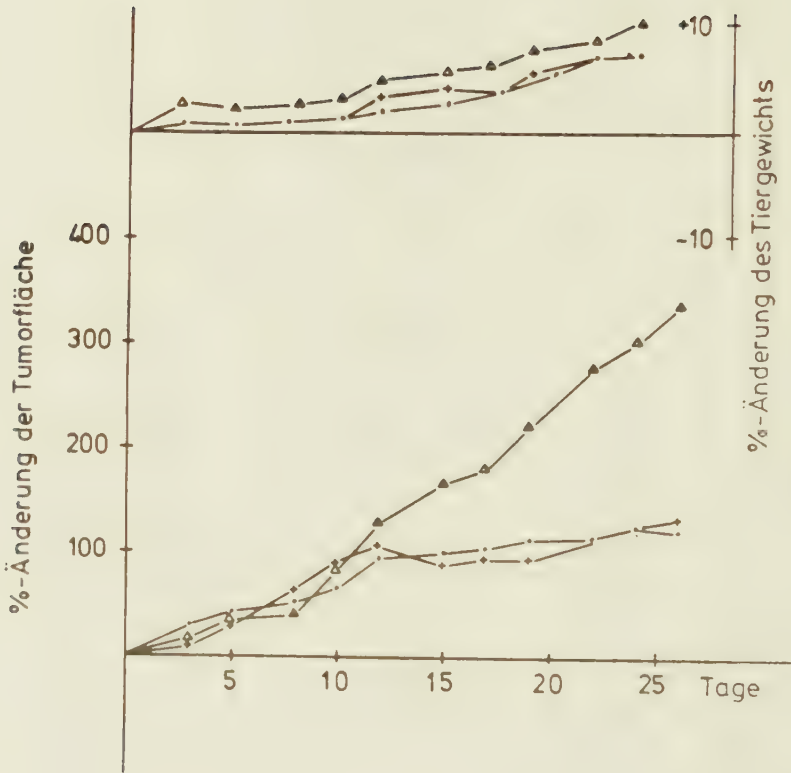


Abb. 19:

DMBA-induzierter Mammatumor der SD-Ratte

Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach
Behandlung mit racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin (Verb.Nr. 2.48 a)

Dosierung: 3 x 15 mg/kg KG/Woche

Therapiedauer: 26 Tage

▲ : Kontrolle

+ : 2.48a ip

* : 2.48a sc

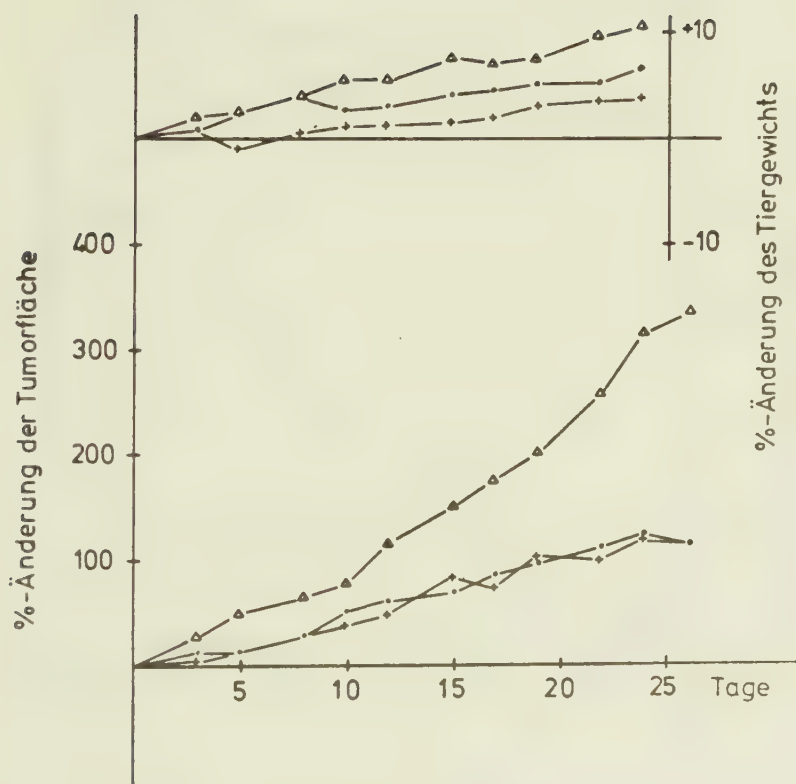


Abb. 20:

DMBA-induzierter Mammatumor der SD-Ratte

Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach
Behandlung mit (+)- und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxy-
phenyl)-äthylendiamin (Verb.Nr. 2.75 und 2.74)

Dosierung 3 x 20 mg/kg KG/Woche ip

Therapiedauer: 26 Tage

△: Kontrolle

•: D. 2.75

◊: D. 2.74

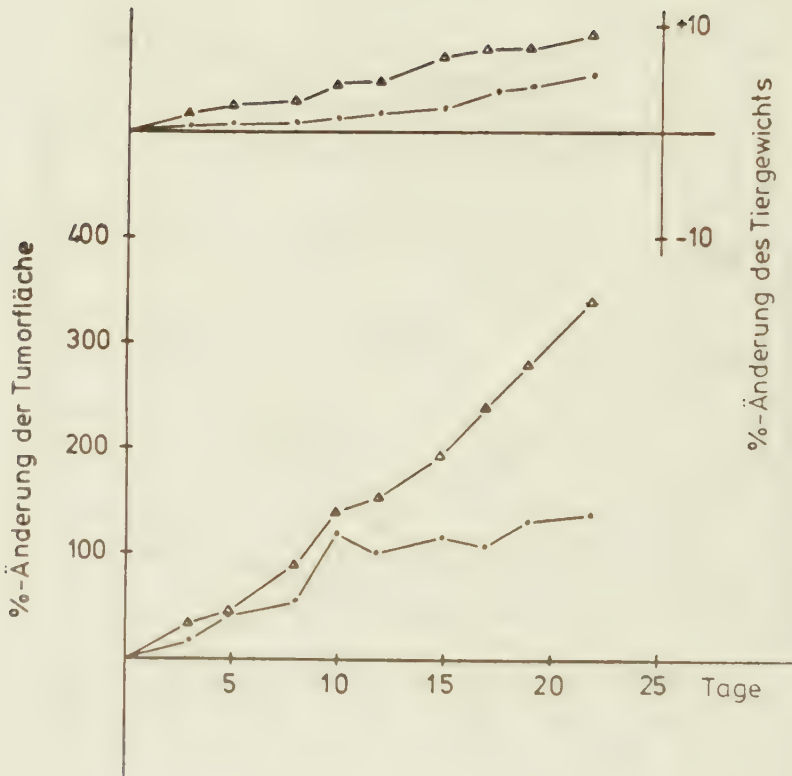


Abb. 21: DMBA-induzierter Mammatumor der SD-Ratte
 Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach
 Behandlung mit racem-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
 äthylendiamin (Verb.Nr. 2.63)
 Dosierung: 3 x 25 mg/kg KG/Woche ip
 Therapiedauer: 22 Tage
 ▲ : Kontrolle ○ : Verb.Nr. 2.63

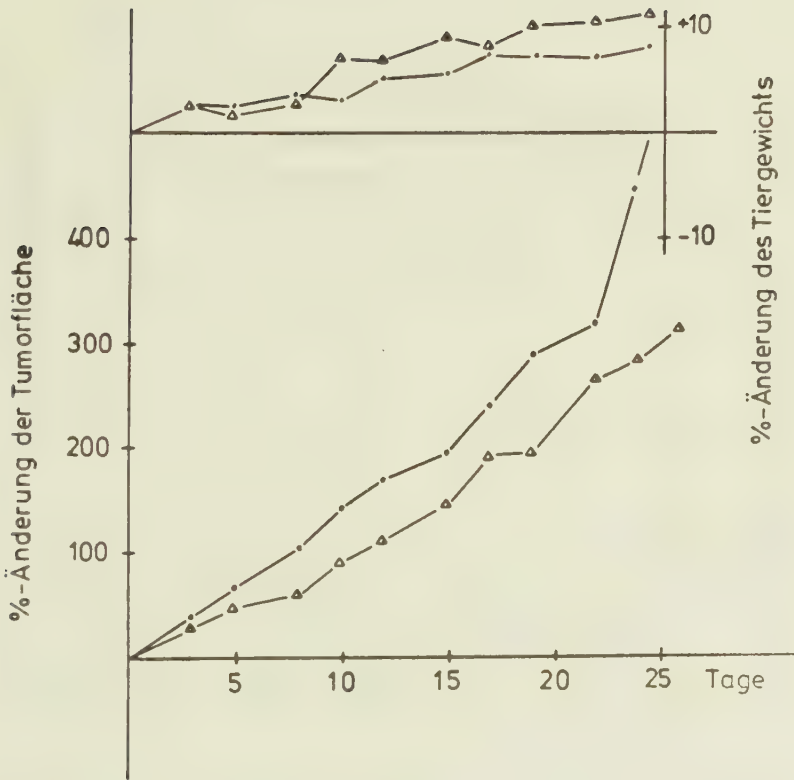


Abb. 22:

DMBA-induzierter Mammatumor der SD-Ratte

Beeinflussung der Tumorfläche und des Körpergewichts nach
Behandlung mit meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin (Verb.Nr. 2.48b)

Dosierung: 3 x 15 mg/kg KG/Woche ip

Therapiedauer: 26 Tage

▲ : Kontrolle

• : Verb.Nr. 2.48b

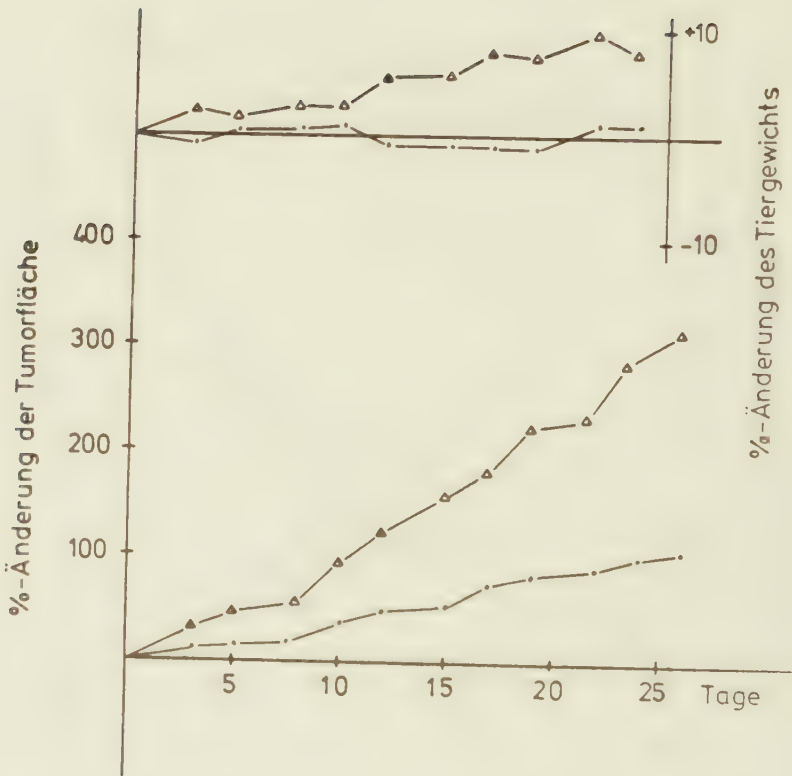


Abb. 1

DMBA-induzierter Mammatumor der SD-Ratte

Beeinflussung der Tumoorfläche und des Körpergewichts nach
Behandlung mit trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-
imidazolidin (Verb.Nr. 2.65)

Dosierung: 3 x 15 mg/kg KG/Woche ip

Therapiedauer: 26 Tage

Δ : Kontrolle ° : Verb.Nr. 2.65

2.1.6. Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese des Walker-256-Carcinosarkoms sowie Bestimmung der cyto-toxischen Wirkung

Methodik siehe 'Experimenteller Teil' (98)

Es wurde eine Auswahl von Rezeptor-affinen Verbindungen (Subst. Nr. 2.48a, 2.48b, 2.63) auf Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese des Walker-256-Carcinosarkoms sowie auf cytotoxische Wirkung getestet.

Bei einer Höchstkonzentration von 10^{-4} M zeigte keine der getesteten Substanzen einen Hemmeffekt.

2.1.7. Beeinflussung des Serumprolaktinspiegels durch meso- und racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin

Um den Einfluß von N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin auf den Serumprolaktinspiegel zu bestimmen, wurde in Anlehnung an Cassedy und Li (47) ein Experiment mit Reserpin behandelten männlichen SD-Ratten durchgeführt.

Zur Methode der Bestimmung siehe 'Experimenteller Teil'

Meso- und racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin wurden in einer einmaligen Gabe von 80 mg/kg i.p. appliziert.

Ergocornin, als positive Kontrolle, in einer Dosis von 50 µg/kg (47).

Die Ergebnisse werden in Prozent der Prolaktin-senkenden Wirkung von Ergocornin angegeben.

Racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin senkt den Prolaktinspiegel unter diesen Bedingungen nicht signifikant ($\alpha > 0,5$ - student's t-Test).

Meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin erhöht den Prolaktinspiegel unter diesen Bedingungen nicht signifikant ($\alpha > 0,5$) (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17:

Beeinflussung des Serum-Prolaktin-Spiegels durch meso- und racem-N,N'-Di-
äthy-1,2-di-4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin bzw. Ergocornin

Verb. Nr.	Tier- zahl	Kontrolle a) Prolaktin	Behandelt a) Prolaktin	Hemmung %	Signifi- kanz b)	Hemmung c)
Ergo- cornin	7	41,36 ± 12,7	33,2 ± 4,6	48,7	p 0,02	-
2.49 a	7	45,36 ± 12,7	38,4 ± 21,0	15,4	NS	31,6
2.43 b	7	45,36 ± 12,7	69,3 ± 69,3	-53,5 d)	NS	-109,3 d)

a) Nanogramm NIAMD-Prolaktin-PR-1 pro ml Serum

b) Statistische Auswertung: t-Test nach Student, NS = nicht signifikant

c) Bezogen auf Ergocornin-Wirkung (= 100%)

d) Erhöhung des Prolaktin-Spiegels

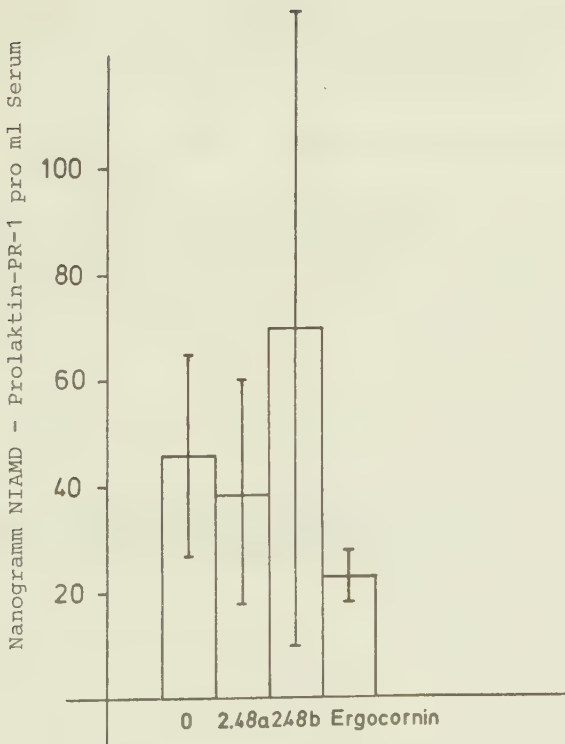


Abb. 24:

Beeinflussung des Serum-Prolaktin-Spiegels durch
meso- und racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin bzw. Ergocornin

2.1.8. Beeinflussung des Serum-Östradiol-Spiegels durch
(+)- und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin.

Um den Einfluß von (+)- und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin auf den Serum-Östradiol-Spiegel zu bestimmen, wurde in Anlehnung an Nicholson und Golder (46) ein entsprechendes Experiment durchgeführt.

Die Langzeitbehandlung (4 Wochen) von DMBA-Tumor-tragenden Tieren in einer Dosierung von 25 mg/kg/3xwöchentlich zeigte keine Änderung des Plasma-Östradiol-Spiegels im Vergleich zur Kontrolle.

(Bestimmungsmethode siehe Experimenteller Teil)

2.1.9. Beeinflussung von p-Nitrophenylphosphatase bzw. Glucose-6-P-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase in DMBA-induzierten Mammatumoren, nach 4-wöchiger Behandlung mit (+)- und (-)- N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin. (Verb.Nr. 2.74 u. 2.75)

Nach 4-wöchiger Behandlung mit Substanz Nr. 2.74 und 2.75 wurden die Tumoren entnommen und nach dem in D.4.5.2. beschriebenen Schema in KH- und TH-Tumoren eingeteilt.

Die Untersuchung auf p-Nitrophenylphosphatase- und Dehydrogenaseaktivität ergab Werte, die in dem für wachsende bzw. regressive Tumoren erwarteten Bereich lagen.

Tabelle 18: Einfluß von (+)- und (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxy-phenyl)-äthylendiamin auf die Enzymaktivitäten von DMBA-induzierten Mammatumoren (Angaben in $\mu\text{M/ml}$)

Subst. Nr.	p-Nitrophenylphosphatase		Dehydrogenase-Aktivität	
	wachsend	regressiv	wachsend	regressiv
Kontr.	41,2 $\pm$ 8,6	50,7 $\pm$ 9,8 NS	200,8 $\pm$ 31,4	137,4 $\pm$ 18,3 S
2.74	39,4 $\pm$ 10,1	48,4 $\pm$ 8,8 NS	191,7 $\pm$ 27,7	101,8 $\pm$ 23,7 S
2.74	42,8 $\pm$ 8,0	44,9 $\pm$ 6,3 NS	183,3 $\pm$ 18,7	121,3 $\pm$ 30,2 S

NS = nicht signifikant

S = signifikant, $p < 0,05$

3. Diskussion

3.1. Allgemeines

Die synthetischen Oestrogene Diäthylstilböstrol (DES) und Hexöstrol (HEs) zeigen am hormonabhängigen Mammacarcinom in hoher Dosierung eine ausgeprägte antitumorale Wirkung, in physiologischen Dosen jedoch einen wachstumstimulierenden Effekt.

In unserem Arbeitskreis wurden unter Verwendung des Biososterieprinzips [5,20] N-isostere Hexöstrole mit dem Ziel, die wachstumstimulierenden von den tumorhemmenden Eigenschaften abzutrennen, synthetisiert.

Zu diesem Zweck wurden die C-Atome 2 und 6 des Hexöstrols durch -NH- ersetzt [5]. Das N-isostere Hexöstrol, meso-N,N'-Dimethyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin, wurde in der vorliegenden Arbeit unter Veränderung der N-Alkylkettenlänge, der Stellung der phenolischen OH-Gruppe und durch zusätzliche Substitution von Cl in verschiedenen Ringpositionen systematisch variiert. In die Untersuchungen waren Diastereomere und Enantiomere miteinbezogen.

Im ersten Schritt unserer Untersuchungen wurde in vitro die Affinität der N,N'-Dialkyl-1,2-di-phenyläthylendiamine zum Oestradiol-Rezeptor geprüft. Substanzen, die mit Oestradiol-Rezeptoren in Wechselwirkung treten, können oestrogene, aber auch antiöstrogene Wirkungen aufweisen. Zum Nachweis agonistischer bzw. antagonistischer Wirkung sind Tierversuche wie die Prüfung auf uterotrope bzw. antitumorale Wirkung an der Maus nach Geriman erforderlich.

3.2. Einfluß verschiedener Substituenten auf die Affinität zum Oestradiol-Rezeptor

Von den hier untersuchten Diastereomeren N,N'-Dialkyl-1,2-di-phenyläthylendiaminen reichte sich ausschließlich die Racemform durch eine Affinität zum Oestradiol-Rezeptor aus. Mesoform-

men waren inaktiv.

Dieser Befund gibt einen weiteren Hinweis auf die Fähigkeit des Rezeptors, stereochemische Unterschiede zu erkennen, was auf seine Proteinnatur zurückzuführen ist. Unterschiedliche Rezeptoraffinitäten von meso- und racem-HES bzw. cis- und trans-DES sind bereits bekannt. α -Oestradiol besitzt im Gegensatz zu β -Oestradiol keine Affinität zum Oestradiol-Rezeptor (97).

Als weitere Einschränkung für die untersuchten Racemate gilt, daß nur Verbindungen mit phenolischen OH-Gruppen zur Ausbildung einer Oestradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung in vitro befähigt sind. Racem-N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamine mit Methoxy-, Aethoxy-, Butoxy- bzw. Benzyloxygruppen im Ring verhalten sich inaktiv. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von G. Kranzfelder (98) überein. Auch bei anderen Substanzklassen ist ein derartiger Effekt beschrieben. So besitzt z.B. Mestranol, der Methyläther des Aethinylöstradiols, das Bestandteil der meisten hormonalen Kontrazeptiva ist, keine Rezeptoraffinität (99). In vivo wird Mestranol zur Wirkform metabolisiert.

Bereits 1946 wurde von F.W. Schueler (101) postuliert, daß für die Östrogene Wirkung, und somit auch für die Rezeptoraffinität einer Verbindung, zwei Hydroxylgruppen oder andere H-Brückenaktive Gruppen an C-Atomen mit einem Abstand von ca. 8,55 Å vorhanden sein müssen. Die Zentren der Sauerstoffatome sollten einen Abstand von 12,45 Å haben.

Betrachtet man das Molekül von racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin anhand eines Dreiding-Modells und legt die aromatischen Ringe und die Kohlenstoffatome C₁ und C₂ in eine Ebene, so mißt man bei trans-Ständigkeit der Arylreste einen Abstand der beiden phenolischen OH-Gruppen von 11,9 Å, was dem von Schueler geforderten Abstand von 12,45 Å sehr nahe kommt. Diese Verbindung zeichnet sich durch eine hohe Rezeptoraffinität ($K_1 = 2,75 \times 10^{-7}$) aus.

Die Verlagerung der OH-Gruppe in 3-Stellung ergibt einen Bindungsabstand von 11,1 Å, die Verlagerung in 2-Stellung einen Abstand von 7,2 Å. Mit der Verlagerung der OH-Gruppen nimmt auch die Affinität zum Oestradiol-Rezeptor stark ab. Diese Ergebnisse

decken sich mit den Befunden von G. Kranzfelder bei der Untersuchung von isomeren Hexöstrolen (HES). Die Rezeptoraffinität der isomeren Hexöstrole nimmt ebenfalls vom 4,4'-HES über 3,3'-HES zum 2,2'-HES stark ab ($K_1 = 1,2, 5,0, 660 \times 10^{-9}$). Die über phenolische OH-Gruppen ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen zum Rezeptor sind stark gerichtete Kräfte (102) und erfordern eine entsprechende Anordnung der Donor- und Akzeptorgruppen im Wirkstoff-Rezeptor-Komplex.

Nach Gill (103) sind jedoch Abstände zwischen Donor- und Akzeptormolekül bis zu 2,7 Å möglich; größere Abstände ($> 3,0$ Å) bewirken eine starke Abnahme der Anziehungskräfte.

Neben Wasserstoffbrückenbindungen nehmen auch hydrophobe Wechselbeziehungen an der Bindung zum Rezeptor teil. Man vermutet (98), daß diese zwischen dem Diphenyläthanskelett und einem hydrophoben Rezeptorareal ausgebildet werden. Solche Bindungen werden auch für natürliche Oestrogene diskutiert. Sie besitzen eine gestreckte Molekülform (trans-Verknüpfung der Ringe BC und CD). Man nimmt an, daß diese eine maximale Annäherung an das Rezeptorareal ermöglicht, eine Voraussetzung für die Ausbildung hydrophober Bindungen (97).

Betrachtet man das rezeptoraffine racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin anhand eines Dreidring-Modells und richtet das Molekül so aus, daß die beiden trans-ständigen Aromaten und die C-C-Einfachbindung etwa in einer Ebene liegen (optimale Voraussetzung zur Annäherung am Rezeptorareal), so sind beide Stickstoffe benachbart oberhalb der Ebene angeordnet. Sie behindern die Annäherung des Moleküls an den Rezeptor nicht. N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamine liegen bei physiologischem pH-Wert in der nichtprotonierten Form vor, was eine Annäherung der Stickstoffe ermöglicht. Diese Konstellation führt möglicherweise auch zu einer Annäherung der N-Alkylketten, was eine Stabilisierung durch Ausbildung von hydrophoben Wechselbeziehungen zwischen den Alkylketten möglich erscheinen läßt.

Racem-N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamine lassen sich unter milden Bedingungen mit Paraformaldehyd und Schwefelkohlenstoff

unter Bildung von Imidazolidinen bzw. Imidazolidin-thionen umsetzen (8). Diese Ringschlüsse sind nur bei optimaler Annäherung der beiden Aminstickstoffe möglich. Der Ringschluß von racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Bindungsabstand der OH-Gruppen 11,9 Å; $K_i = 2,75 \times 10^{-7}$) zum trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin führt zu einer geringen Verbesserung der Rezeptoraffinität (Bindungsabstand der OH-Gruppen 11,3 Å, $K_i = 8,5 \times 10^{-8}$).

Die ähnlichen K_i -Werte von racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin und dem davon abgeleiteten Imidazolidin deuten darauf hin, daß das Diphenyläthylendiamin bei der Rezeptorwechselbeziehung eine vergleichbare Anordnung des Diphenyläthanskeletts (trans-ständige Aromaten) aufweist. Im Vergleich zu 4,4'-HES bedingen die Stickstoffe von N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiaminen eine Abschwächung des hydrophoben Charakters, was zu einer geringeren Rezeptoraffinität und zu einer erhöhten Reversibilität der Rezeptorbindung führt (4,4'-HES: $K_i = 1,6 \times 10^{-9}$; Reversibilität: 12%; Subst.Nr. 2.48a: $K_i = 2,75 \times 10^{-7}$; Reversibilität: 84%).

Variiert man die Alkylkettenlänge von N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiaminen, so nimmt die Rezeptoraffinität von Methyl, Äthyl, Isopropyl, n-Propyl bis n-Butyl zu und über Pentyl, Hexyl wieder ab.

Dieser Befund deutet darauf hin, daß die N-Alkylketten durch hydrophobe Wechselbeziehung mit entfernteren Rezeptorarealen an der Bindung des Wirkstoffmoleküls mitbeteiligt sind. Verbindungen mit kurzkettingen N-Alkylgruppen werden aufgrund ihres hydrophilen Charakters nicht gebunden. Beim N-Butyl-Homologen ist die hydrophobe Wechselbeziehung am stärksten ausgeprägt. Verzweigt-kettige N-Alkylgruppen und langkettige Reste wie N-Pentyl bzw. N-Hexyl scheinen die Annäherung des Moleküls an den Rezeptor zu behindern.

Meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Subst. Nr. 2.48b), das Diastereomere des hoch rezeptoraffinen racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin, zeigt wie alle meso-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)äthylendiamine keine Affinität zum Oestradiol-Rezeptor. Im Gegensatz zur Ra-

cemform sind bei Subst. Nr. 2.48b in einer Konfiguration mit optimalem OH-Abstand die beiden N-Butyl-Gruppen transständig angeordnet. Eine der beiden Aminoalkylgruppen behindert zwar die Annäherung des Moleküls an das Rezeptorareal, das völlige Fehlen der Rezeptoraffinität ist damit jedoch nicht erklärbar.

Am Beispiel von meso-3,3'-HES zeigte H. Schmitt-Wallenborn (104), daß mit zunehmender Alkylkettenlänge (von $C_2 - C_4$) die Affinität zum Oestradiol-Rezeptor zwar abnimmt, aber bei einer Alkylkettenlänge von C_4 die Rezeptoraffinität immer noch in einem Bereich von $10^{-8}M$ liegt.

Entscheidend für das Fehlen der Rezeptoraffinität von meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin dürfte neben sterischen Effekten in erster Linie die Behinderung der hydrophoben Wechselbeziehungen durch die polare Aminoalkylgruppe sein. Die Trennung von racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin in seine optischen Antipoden brachte eine erhebliche Verbesserung des K_i -Wertes. Die Rezeptoraffinität des (+)-Antipoden ($K_i = 4,79 \times 10^{-8}$) ist um ca. zwei Zehnerpotenzen höher als die des (-)-Antipoden ($K_i = 1,43 \times 10^{-6}$), ein Hinweis auf den asymmetrischen Bau des Rezeptors (Proteinatur).

Die Einführung von Chlor in die aromatischen Ringe führt zu einer Erhöhung der Rezeptoraffinität. So erhöht sich der K_i -Wert von $> 10^{-4}$ bei racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin auf $K_i = 1,2 \times 10^{-6}M$ durch Einführung eines zusätzlichen Cl-Substituenten in 6-Position (racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(6'-chlor-3'-hydroxyphenol)-äthylendiamin).

Schon früher (98) wurde eine Verbesserung der Rezeptoraffinität durch Ringchlorierung beschrieben. Racem-N,N'-Dipropyl-1,2-di-phenyl-äthylendiamin zeigt keine Rezeptoraffinität. Die Einführung von 2 Chloratomen in 2,6-Stellung führt zu einer rezeptoraffinen Verbindung ($K_i = 1,2 \times 10^{-6}$). Interessanterweise zeigen bei dieser Verbindung sowohl Meso- als auch Racemform Rezeptoraffinität.

Es ist bekannt, daß durch ringhalogenierung eine Steigerung der hydrophoben Wechselwirkung möglich ist (111).

3.3. Die Prüfung der rezeptoraffinen N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine auf uterotrope und antiuterotrope Wirkung brachte in beiden Fällen negative Ergebnisse.

Dieser Befund war überraschend, nachdem aufgrund der hohen Rezeptoraffinität entweder eine agonistische oder antagonistische Wirkung zu erwarten wäre.

Die Untersuchung auf Reversibilität der Rezeptorbindung zeigte, daß die Bindung der Substanzen zum Oestradiol-Rezeptor im 'hot chase-Experiment' hoch reversibel war (80 - 90%). Durch diesen Befund kann die fehlende uterotrope bzw. antiuterotrope Wirkung der Substanzen erklärt werden. Die Substanzen haften nicht lange genug am Rezeptor, um eine Wirkung hervorzurufen.

Fehlende oder schwache östrogene und antiöstrogene Eigenschaften bei Verbindungen mit hoher Rezeptoraffinität wurden bereits von Terenius (105) mit einer hohen Reversibilität der Wirkstoff-Rezeptor-Bindung erklärt. Meso-Butöstrol zeigt nur bei lokaler vaginaler Anwendung antiöstrogene Eigenschaften. Bei subcutaner Applikation ist meso-Butöstrol unwirksam.

3.4. Zur Wirkung am DMBA-induzierten Mammacarcinom der Ratte

Eine Auswahl von racem-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine (Subst. Nr. 2.48a, 2.74, 2.75, 2.63) und trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin (Subst. Nr. 2.65) wurden einer eingehenden Untersuchung am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinom der Ratte unterzogen. Alle untersuchten Substanzen zeigten bei einer Dosis von 15-20 mg/kg eine ausgeprägte, statistisch abgesicherte tumorhemmende Wirkung (T/C^{+}) 0,33-0,38). Nafoxidin, nach 3,3'-Hexöstrol das stärkste Antiöstrogen, wies dagegen nur ein T/C^{+} von 0,57 (98) auf. Meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Subst. Nr. 2.48b), das nicht rezeptoraffine Diastereomere zur wirksamen Substanz 2.48a, verstärkt das Tumorstadium nicht signifikant ($T/C = 1,49$).

+) Definition: siehe 'Experimenteller Teil'

Die Untersuchung der Tumoren auf p-Nitrophenylphosphatase-Aktivität erbrachte nicht signifikante Unterschiede zwischen wachsenden und regressiven Tumoren. Die Werte für Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase der regressiven Tumoren unterschieden sich signifikant von denen für wachsende Tumoren.

Eine Beeinflussung des Serum-Östradiol-Spiegels durch Subst.Nr. 2.74 und 2.75 konnte nicht nachgewiesen werden.

Für die tumorhemmende Wirkung der Verbindungen sind prinzipiell folgende Wirkungsmechanismen in Betracht zu ziehen:

- I. Direkter Angriff an der Tumorzelle
 - I.1. Hemmung des spezifischen Transportes von Östradiol durch die 'target'-Zellmembran
 - I.2. Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung
 - I.3. Hemmung der Östradiol-bedingten Nucleinsäure- und Proteinbiosynthese
 - I.4. Antagonisierung der Prolaktinwirkung am Tumor
- II. Hemmung der Prolaktinausschüttung im Hypophysenvorderlappen (HVL)
 - II.1. Hemmung der Östradiol-bedingten Stimulierung der Prolaktinausschüttung im HVL, bzw. Antagonisierung der Östradiol-bedingten Hemmung der PIF-Ausschüttung im Hypothalamus
 - II.2. Catecholamineigenwirkung - Neurotransmitter für PIF -
 - II.3. Hemmung der Monaminoxidase - Verstärkung der Wirkung von körpereigenen Catecholaminen
 - II.4. Hemmung des 'Uptake-Mechanismus' - Verstärkung der Wirkung von körpereigenen Catecholaminen -
- III. Cytocide Eigenschaften

Trotz unterschiedlich starker Beeinflussung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung (K_1 von 10^{-6} bis 10^{-8}) konnte bei den getesteten Verbindungen eine Korrelation der Rezeptoraffinitäten mit der tumorhemmenden Wirkung nicht festgestellt werden. Die tumorhemmenden Effekte der Verbindungen waren annähernd gleich.

Das DMBA-Tumormodell ist nicht geeignet, feine Unterschiede in der Antitumorwirkung herauszustellen.

3.4.1. Direkter Angriff am Tumor

Zu I.1.

4,4'-Diäthylstilböstrol besitzt nur eine geringe Affinität zum Membranrezeptor (98). Nachdem die hier getesteten Substanzen strukturell große Ähnlichkeit mit 4,4'-DES besitzen, scheint ein Angriff am Östradiol-Transport-System unwahrscheinlich.

Zu I.2.

Die hier untersuchten Verbindungen hemmen in vitro die Bindung von Östradiol am cytoplasmatischen Rezeptor kompetitiv. Die Bindung zum Rezeptor ist aber bei allen Verbindungen hoch reversibel. Die Haftfähigkeit der Verbindung am Östradiol-Rezeptor reicht nicht aus, um in vitro das Wachstum von Uteri juveniler Mäuse zu stimulieren oder zu hemmen. Es ist jedoch denkbar, daß beim Tumorversuch über einen längeren Zeitraum trotz hoher Reversibilität ein Teil der applizierten Substanz an den cytoplasmatischen Rezeptor gelangt und so in geringem Maß die Ausbildung von Östradiol-Rezeptor-Komplex und die Transformation zur kerngängigen Form antagonisiert. Diese schwach antagonistischen Effekte reichen aber nicht aus, um die starke mammatumorhemmende Wirkung der Substanzen zu erklären.

Eine andere Erklärung wäre die diskutierte unterschiedliche Struktur der Östradiolrezeptoren verschiedener 'target-Gewebe'. Zur Klärung dieser Frage wären vergleichende Untersuchungen zur Affinität und Reversibilität der Diphenyläthylendiamine unter Verwendung von Cytosolen aus Ratten-Mammatumoren und Mäuseuteri erforderlich.

Zu I.3.

Untersuchungen zur Beeinflussung des E_2 -induced Protein (113) und der Rezeptorneosynthese (114) durch N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamine wurden bisher nicht durchgeführt.

zu I.4.

J. Meites stellte fest, daß Prolaktin das Wachstum von Mammatumoren durch 'periphere Wirkung an der Brustdrüse' stimuliert (106). Er stellte weiter fest, daß hohe Dosen von Östrogen (Östradiolbenzoat) die 'periphere Wirkung' von Prolaktin stören und dadurch einen Rückgang der Tumoren bewirken (107). Dieser Befund und die Behauptung, daß hohe Dosen von Östrogenen eine Tumorregression durch Interaktion mit Prolaktin hervorrufen, scheint fragwürdig.

Auch 4,4'-DES bewirkt in hohen Dosen einen Rückgang von Mammatumoren, allerdings ist der Tumorrückgang von einer drastischen Reduzierung des Körpergewichts begleitet (20). Östrogene wie 4,4'-DES wirken appetitzügelnd. E. Hoffmann (20) zeigte, daß ohne Substanzgabe, durch einfache Futtereinschränkung ein Rückgang von DMBA-induzierten Mammatumoren zu beobachten ist.

Appetitzügelnde Effekte weisen auch die untersuchten racem-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine in hohen Dosen (> 50 mg/kg) auf. Interessanterweise wirken die entsprechenden Mesoformen in der selben Weise. Dieser Befund wird von E. Hoffmann (20) auch an anders substituierten N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiaminen bestätigt. Aus diesem Grund wurde im DMBA-Tumorversuch mit unseren Verbindungen Dosierungen gewählt, bei denen diese Effekte nicht zum Tragen kommen (< 30 mg/kg). Auch bei diesen geringen Dosen wurde das Tumorwachstum signifikant gehemmt, wohingegen Östrogene in geringen Dosen (= keine Gewichtsreduktion) das Wachstum des DMBA-induzierten Mammatumors stimulieren.

Wenn die Behauptung, daß Östrogene und Prolaktin um Bindungsstellen 'an der Peripherie des Tumors' konkurrieren stimmen sollte, lassen sich damit die tumorhemmenden Effekte von Diphenyläthylendiaminen in niederen Dosen nicht erklären. Es wäre allerdings möglich, daß Diphenyläthylendiamine stärker um die periphere Angriffstelle des Prolaktins konkurrieren als Östrogene. Solange aber die Angriffstelle des Prolaktin am Tumor und dessen Wirkungsmechanismus nicht geklärt ist, bleiben solche Überlegungen reine Spekulation.

3.4.2. Angriff auf hypophysär-hypothalamischer Ebene

zu II.

II.1.

Östrogene fördern die Ausschüttung von Prolaktin im Hypophysenvorderlappen (HVL) durch einen direkten Angriff im HVL und durch eine Unterdrückung der Ausschüttung von Prolaktin-Inhibiting-Factor (PIF) im Hypothalamus. In beiden Organen wurden Östrogen-Rezeptoren nachgewiesen (86).

Das Wachstum von hormonabhängigen Tumoren ist von der Serumprolaktin-Konzentration abhängig (62, 96).

Die hier untersuchten racem-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine zeichnen sich durch eine hohe Affinität zum Östradiol-Rezeptor, einer stark tumorhemmenden Wirkung und der Fähigkeit den Serumprolaktin-Spiegel zu senken, aus.

Racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin hemmt das Tumorstadium und senkt den Serumprolaktin-Spiegel (15,4%). Die entsprechende Mesoform fördert das Tumorstadium und erhöht den Prolaktinspiegel (53,5%).

Es ist denkbar, daß die Haftfähigkeit der untersuchten Verbindungen am hypophysären und hypothalamischen Rezeptor ausreicht, um den Prolaktin-stimulierenden Effekt körpereigener Östrogene zu antagonisieren.

In vitro-Untersuchungen von Nicoll und Meites (108) haben gezeigt, daß bereits geringe Dosen an Östradiol ausreichen (0,05 µg/ml), um Prolaktin aus isolierten Hypophysen freizusetzen. Für eine Stimulierung am Uterus sind bedeutend höhere Dosen notwendig (0,32 µg). Die Beziehung Dosis zu Effekt am Uterus ist nicht unbedingt mit der auf hypophysär-hypothalamischer Ebene gleichzusetzen.

zu II.2.

Catecholamine wirken als Neurotransmitter für PIF auf der Ebene der Eminencia mediana. Untersuchungen mit Epinephrin und Dopamin in vitro (87) bzw. direkte Applikation dieser Substanzen im 3. Ventrikel in vivo zeigten eine deutliche erhöhte Ausschüttung und/oder Synthese von PIF.

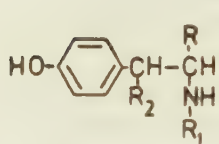
Meites postulierte (87, 89, 90), daß biogene Amine möglicherweise identisch mit PIF sind.

Aufgrund neuerer Forschungsergebnisse wurde dieses Postulat widerlegt. Es handelt sich um ein Peptid.

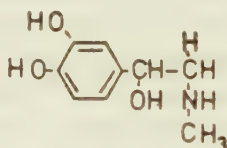
Intraperitoneale Applikation von Epinephrin beeinflusst die Ausschüttung von PIF nicht (87, 91) - Blut-Hirn-Schranke -.

Intraperitoneale Injektionen von l-Dopa, dem Precursor von Dopamin, erniedrigt den Serum-Prolaktin-Spiegel signifikant (87).

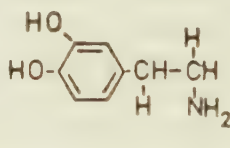
N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine haben eine gewisse strukturelle Ähnlichkeit mit Nor-adrenalin, beziehungsweise l-Dopamin.



Diphenyläthylendiamin



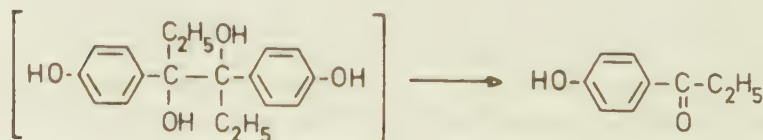
Adrenalin



Dopamin

Ringhydroxylierung ist bei der Metabolisierung von Phenolen bekannt.

M. Metzler (109) fand bei der Metabolisierung von Diäthylstilböstrol ein Metabolisierungsprodukt, dessen Entstehung durch oxidative Spaltung eines vicinalen Diols postuliert wurde.



Es ist denkbar, daß bei der Metabolisierung von N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamin ein analoger Abbau unter Bildung von Schiff'schen Basen stattfindet. Eine weitere Metabolisierung könnte zu Benzylaminen führen, die als Hemmstoffe der MAO beschrieben sind (100).

zu II.3.

MAO-Hemmer erhöhen die Catecholaminaktivität durch Blockade der enzymatischen Desaktivierung. Dadurch wird die PIF-Aktivität im Hypothalamus erhöht⁷ (92, 93 - S. 703). Untersuchungen von D. Stransky (100) haben gezeigt, daß Benzylamine - halbes Diphenyläthylendiamin-Molekül - die Aktivität der Monaminoxidase zu hemmen vermögen. Das unter II.2. beschriebene Metabolisierungsschema könnte zu derartigen Molekülen führen.

zu II.4.

Untersuchungen mit racem-N,N'-Diisopropyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (110) zeigten eine Verstärkung der Adrenalinwirkung am Meerschweinchenpapillarmuskel bei einer Grenzkonzentration von $1,6 \times 10^{-6}$ M. Der genaue Mechanismus konnte bisher nicht geklärt werden, doch wird vermutet, daß es sich um eine Cocain-ähnliche Wirkung, d.h. um einen Eingriff in den 'uptake-Mechanismus' handelt (110). Die Prolaktin-senkende Wirkung der hier untersuchten Substanzen könnte über einen solchen Mechanismus ablaufen. Im Widerspruch zu den Ergebnissen von Brandt (110) steht die fehlende Prolaktin-senkende und tumorhemmende Wirkung der analogen Mesoverbindungen. Bei Brandt zeigt auch meso-N,N'-Diisopropyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin eine Adrenalin-verstärkende Wirkung am Meerschweinchen-Papillarmuskel. Allerdings liegt hier die Grenzkonzentration höher ($2,6 \times 10^{-5}$).

zu III.

Keine der untersuchten racem-N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine zeigte bei einer Höchstkonzentration von 10^{-5} M eine cytocide Wirkung.

3.5. Abschließende Betrachtungen

Es ist unwahrscheinlich, daß die tumorhemmenden N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamine über nur einen der beschriebenen möglichen Mechanismen wirken. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse lassen eher ein gemischtes Wirkbild vermuten.

Es bedarf daher weiterer Anstrengung, den genauen Wirkungsmechanismus der tumorhemmenden N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamine aufzuklären.

D. Experimenteller Teil

1. Allgemeine Synthesevorschriften

1.1. Verfahren zur Herstellung von t-Butylhypochlorit (1, 2)

Eine Lösung von 80 g (2 Mol) Natriumhydroxid in 500 ml Wasser wird in einen 2l-Dreihalskolben, der mit Gaseinleitungsrohr, Gasausleitungsrohr und Rührer ausgerüstet ist, gegeben und im Eisbad auf +10°C gekühlt. Dann wird eine Lösung von 74 g (1 Mol) t-Butanol in 500 ml Wasser hinzugegeben. Unter konstantem Rühren wird Chlor in die Mischung eingeleitet, und zwar 30 Minuten lang mit einer Rate von 1 l pro Minute und dann für weitere 30 Minuten mit einer Rate von 0,5 l pro Minute. Die entstandene ölige Schicht wird im Scheidetrichter abgetrennt. Sie wird solange jeweils mit 50 ml 50% Natriumkarbonatlösung gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr sauer auf Kongorot reagiert. Zum Schluß wird 4 x mit dem gleichen Volumen Wasser gewaschen und das Produkt dann über Calciumchlorid getrocknet. Das Produkt wird sofort weiterverarbeitet.

Ausbeute: 82% d.Th.

Vorsicht: Die Herstellung muß in einem guten Abzug erfolgen. Das Produkt muß vor starker Lichteinwirkung, Erhitzen und Kontakt mit Gummi geschützt werden.

1.2. Verfahren zur Herstellung von chlorierten Methoxy- und Hydroxybenzaldehyden

0,5 Mol des entsprechenden Aldehyds werden in 250 ml 90% Essigsäure gelöst und unter Kühlen und Rühren langsam mit 125 ml t-Butylhypochlorit versetzt (Tropftrichter mit Kühlmantel). Die Temperatur im Reaktionsgefäß soll +10°C nicht überschreiten. Die Reaktion ist nach 2-4 Std. beendet. Das Reaktionsprodukt wird im Vakuum eingeeengt und entweder durch Kristallisation oder Destillation isoliert.

1.3. Verfahren zur Herstellung von Benzylidenalkylaminen

0,5 Mol Aldehyd werden in kleinen Anteilen mit 0,6 M primärem Amin unter Schütteln und Kühlen versetzt. Nach Zugabe von etwa 200 ml Chloroform wird die wässrige Oberschicht im Scheidetrichter abgetrennt und die Unterphase nach Trocknung über Natriumsulfat eingeeengt und die Schiffsche Base im Vakuum destilliert. Bei Schiffbasen mit paraständiger OH-Gruppe wird die Chloroformphase mehrfach mit Wasser ausgeschüttelt um überschüssiges Butylamin zu entfernen und anschließend mit Natriumsulfat entwässert. Der Abdampfungsrückstand wird im Hochvakuum getrocknet. Die erhaltenen Produkte sind fast rein.

1.4. Verfahren I zur Herstellung von N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiaminen

1,5 g-Atom kleingeschnittene Aluminiumfolie und eine Lösung von 6,0 g Quecksilber-II-chlorid in 50 ml absolutem Äthanol werden auf dem Wasserbad erhitzt. Nach beginnender Wasserstoffentwicklung läßt man eine Lösung von 0,5 Mol Schiffscher Base in 75 ml absolutem Äthanol zufließen. Die Reaktionslösung wird weiter unter Rückfluß und Rühren erhitzt. Sobald der Ansatz durch Alkoholatbildung zu dickflüssig geworden ist, verdünnt man mit 250 ml Toluol und erhitzt weiter. Nach etwa zwei Stunden ist die Reaktion beendet.

1.5. Verfahren II zur Herstellung von N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiaminen

0,01 Mol Benzpinakol und 0,02 Mol Schiffsche Base werden in 150 ml Isopropanol 2 Tage lang unter Rückfluß erhitzt. Anschließend wird das Lösungsmittel abgezogen und N-Alkylbenzylamin und Benzophenon im Vakuum abdestilliert. Der die diastereomeren N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamine enthaltende Rückstand wird nach Verfahren 1.8 - 1.11 aufgearbeitet.

D. Experimenteller Teil

1. Allgemeine Synthesevorschriften

1.1. Verfahren zur Herstellung von t-Butylhypochlorit (1, 2)

Eine Lösung von 80 g (2 Mol) Natriumhydroxid in 500 ml Wasser wird in einen 2l-Dreihalskolben, der mit Gaseinleitungsrohr, Gasausleitungsrohr und Rührer ausgerüstet ist, gegeben und im Eisbad auf +10°C gekühlt. Dann wird eine Lösung von 74 g (1 Mol) t-Butanol in 500 ml Wasser hinzugegeben. Unter konstantem Rühren wird Chlor in die Mischung eingeleitet, und zwar 30 Minuten lang mit einer Rate von 1 l pro Minute und dann für weitere 30 Minuten mit einer Rate von 0,5 l pro Minute. Die entstandene ölige Schicht wird im Scheidetrichter abgetrennt. Sie wird solange jeweils mit 50 ml 50% Natriumkarbonatlösung gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr sauer auf Kongorot reagiert. Zum Schluß wird 4 x mit dem gleichen Volumen Wasser gewaschen und das Produkt dann über Calciumchlorid getrocknet. Das Produkt wird sofort weiterverarbeitet.

Ausbeute: 82% d.Th.

Vorsicht: Die Herstellung muß in einem guten Abzug erfolgen. Das Produkt muß vor starker Lichteinwirkung, Erhitzen und Kontakt mit Gummi geschützt werden.

1.2. Verfahren zur Herstellung von chlorierten Methoxy- und Hydroxybenzaldehyden

0,5 Mol des entsprechenden Aldehyds werden in 250 ml 90% Essigsäure gelöst und unter Kühlen und Rühren langsam mit 125 ml t-Butylhypochlorit versetzt (Tropftrichter mit Kühlmantel). Die Temperatur im Reaktionsgefäß soll +10°C nicht überschreiten. Die Reaktion ist nach 2-4 Std. beendet. Das Reaktionsprodukt wird im Vakuum eingeengt und entweder durch Kristallisation oder Destillation isoliert.

sation in Methanol/Äther getrennt. Dabei fällt Mesoform als 1. Fraktion.

1.10. Verfahren II zur präparativen Trennung der diastereomeren N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamine

Die diastereomeren Basen werden in wenig Äthanol oder Äther gelöst und bei -18°C 2 bis 4 Wochen gelagert. Nach dieser Zeit scheidet sich meso-ÄDA ab und wird als Dihydrochlorid erneut in Äthanol/Äther umkristallisiert.

1.11. Verfahren III zur präparativen Trennung der diastereomeren N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamine

Das monomere Reaktionsprodukt wird als Base im Hochvakuum abdestilliert, die Diastereomeren werden als Dihydrochloride durch präparative Craig-Verteilung getrennt. Ls I, $n = 12$, O/U = 560/350, $V = 1,5$, Einwaage 30,0 g in Gefäß O. Meso-ÄDA wird aus den Fraktionen 7 bis 12 gewonnen und als Dihydrochlorid durch Umkristallisieren in Äthanol/Äther weiter gereinigt. Der Abdampfrückstand der Fraktionen 0 - 6 (racem-ÄDA und polymere Farbstoffe) wird einer weiteren 12-stufigen Craigverteilung (Ls II, $n = 12$, O/U = 560/350, $V = 1,5$) unterworfen. Racem-ÄDA wird aus den Fraktionen 6 bis 12 gewonnen und als Dihydrochlorid durch Umkristallisieren in Äthanol/Äther weiter gereinigt.

1.12. Verfahren zur Spaltung von Methyläthern

0,01 Mol Base wird in 20 ml wasserfreiem Benzol gelöst und mit 10,7 g (0,04 Mol) Aluminiumbromid wasserfrei (ex Amp.) in 45 ml Benzol versetzt. Nach zweistündigem Kochen unter Rückfluß arbeitet man wie folgt auf:

Das Reaktionsprodukt wird zur Trockne eingedampft, mit Wasser versetzt und mit 3N Ammoniak auf pH 8 bis 9 gebracht. Die entstandene Gallerte wird mit Äther oder Chloroform mehrfach extrahiert, über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel abgezogen. Das phenolische ÄDA wird entweder als Base in Äther oder

als Dihydrochlorid in Methanol/Äther umkristallisiert.

1.13. Verfahren I zur Spaltung von Benzyläthern

1 mMol 4-Benzoyloxyphenyl-äther wird als Base, in Gegenwart von 0,25 g Palladium/Aktivkohle (10%) in 22 ml Chloroform (über Aluminiumoxid neutral filtriert) bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck 12 Stunden mit Wasserstoff geschüttelt. Nach dieser Zeit sind etwa 2 Millimol H_2 (45 ml) aufgenommen. Der Katalysator wird abzentrifugiert, mit heißem Methanol nachgewaschen und nach dem Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum entweder die Base in Wasser oder das Dihydrochlorid in Methanol/Äther umkristallisiert.

1.14. Verfahren II zur Spaltung von Benzyläthern

Die Base wird analog Verfahren I in einer Mischung aus $CHCl_3$ /MeOH 1:1 hydriert. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird in wenig 0,1N NaOH gelöst, filtriert und mit 0,1 N HCl neutralisiert, der Niederschlag wird abgenutscht, mit wenig H_2O gewaschen und am Vakuum getrocknet.

1.15. Verfahren III zur Spaltung von Benzyläthern

0,5 mMol Benzyläther (Base) in 100 ml Eisessig werden in Gegenwart von 1,2 g Palladium/Aktivkohle (10%) bei 40°C und Atmosphärendruck über Nacht hydriert. Nach dieser Zeit ist etwa 1 Millimol Wasserstoff verbraucht. Der Katalysator wird heiß abfiltriert, die Essigsäure im Vakuum abgezogen und der Rückstand in Aceton umkristallisiert.

1.16. Verfahren zur Herstellung von 1,3-Dialkyl-4,5-diphenylimidazolidinen (8).

1 g N,N'-Dialkyl-1,2-diphenyläthylendiamin (Base) wird in 10 ml Chloroform-Benzol 1:1 gelöst und nach Zugabe von 1,2 g Paraformaldehyd 7 Stunden am Rückfluß erhitzt. Danach wird durch ein

trockenes Filter filtriert, das Lösungsmittel abgezogen und umkristallisiert.

1.17. Verfahren zur Herstellung von meso-1,2-di-(2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin

105 g (0,50 Mol) Benzil und 122 g (1 Mol) Salicylaldehyd werden bei 60°C in 750 ml Äthanol gelöst. Man leitet 3 Stunden unter Rühren in schwachem Strom Ammoniak ein. Der kristalline Niederschlag (46) wird abgesaugt, sobald die Lösung abgekühlt ist, mit Äthanol gewaschen und bei 80°C im Vakuum (12 Torr) getrocknet. Ausb. 192,0 g = 76 %.

192 g (0,42 Mol) meso-N,N'-Dibenzoyl-1,2-di-(2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin suspendiert man in 500 ml Acetanhydrid und erhitzt über Nacht (14 Stunden) unter Rückfluß, wobei die Badtemp. konstant zwischen 148 und 150°C gehalten werden muß. Beim langsamen Abkühlen kristallisiert meso-0,0',N,N'-Tetraacetyl-1,2-di-(2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin aus, das abgesaugt und mit wenig Acetanhydrid farblos gewaschen wird. Das Produkt wird in 250 ml 42% Bromwasserstoffsäure/Eisessig (1:1) suspendiert und 3 Stunden zum Sieden erhitzt. Der Niederschlag wird nach dem Abkühlen abgesaugt, in ca. 400 ml heißem Wasser gelöst mit 20% Natronlauge neutralisiert, wobei sich 31a, meso-1,2-Di-(2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin flockig abscheidet. Das aus Benzol oder Acetonitril umkristallisierte Produkt ist ein farblores Pulver vom Schmp. 184-186°C, die Ausbeute schwankte bei verschiedenen Ansätzen zwischen 30,0 g und 63,0 g (25-52%).

1.18. Verfahren zur Herstellung von meso-N,N'-Diarylidene-1,2-diphenyläthylendiamin

0,25 Mol meso-1,2-Diphenyläthylendiamin werden in 300 ml Acetonitril mit 0,5 Mol des entsprechenden Aldehyds 3 Stunden unter Rühren am Rückfluß erhitzt. Man rührt noch weitere 30 Minuten in der Siedehitze, wobei man das Lösungsmittel auf ca. die Hälfte einengt. Die Schiffbase kristallisiert beim Abkühlen in gelben bis orangen Nadeln aus.

1.19. Verfahren zur Herstellung von meso-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin

5 mMol des entsprechenden meso-N,N'-Diarylid-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamins werden in 50 ml 2N H_2SO_4 suspendiert und einer Wasserdampfdestillation unterworfen, bis kein Aldehyd mehr übergeht. Es wird heiß filtriert und die klare Lösung mit 20% Natronlauge bis zur stark alkalischen Reaktion versetzt. Das sich abscheidende Öl wird 3 x mit CHCl_3 ausgeschüttelt, die vereinigten organischen Phasen werden über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Man versetzt mit Äther bis zur leichten Trübung und läßt im Kühlschrank auskristallisieren.

1.20. Verfahren zur Herstellung von racem-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin

55,9 g (0,11 Mol) meso-N,N'-Di-(4'-methoxybenzyliden)-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin werden in einem 1-Liter-Kolben unter Rühren im Luftbad so lange auf 200-220°C erhitzt, bis die Kristallmasse vollständig geschmolzen ist. Das gelbe Öl erstarrt nach dem Abkühlen wieder. Man versetzt mit 300 ml 2N H_2SO_4 und destilliert das Reaktionsgemisch mit Wasserdampf. Sobald kein Aldehyd mehr übergeht, unterbricht man die Destillation und filtriert die saure Lösung heiß. Im Filtrat scheiden sich zuerst farblose, glänzende Blättchen von meso-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiaminsulfat ab. Der rötlichbraune Rückstand, bestehend aus nicht hydrolisierter meso- und racem-Schiffbase, wird wie oben beschrieben, einer weiteren Wasserdampfdestillation unterworfen, und der Vorgang so lange wiederholt (ca. 5x), bis sich im Filtrat farblose, glänzende Blättchen von racem-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiaminsulfat (Subst. Nr. 2.69) abscheiden. Die Sulfate werden im Scheidetrichter mit NaOH überschichtet und je 4 x mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Chloroformauszüge werden über Na_2SO_4 getrocknet, im Vakuum eingeeengt und durch Zusatz von Äther zur Kristallisation gebracht.

1.21. Verfahren zur Trennung von racem-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin in seine optischen Antipoden

10,88 g (40 mMol) racem-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin werden zusammen mit 6,00 g (40 mMol) L(+)-Weinsäure in 80 ml Wasser 10 Minuten am Rückfluß erhitzt. Die Lösung wird filtriert und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es kristallisiert das L(+)-Tartrat des (-)-ÄDA aus, das abgesaugt und in ca. 20 ml Wasser umkristallisiert wird. Das Salz wird mit Natronlauge überschichtet und 3 x mit 20 ml Chloroform ausgeschüttelt. Die gesammelten Chloroformphasen werden über Na_2SO_4 getrocknet, eingengt und der Rückstand wird in Äther umkristallisiert (Subst. Nr. 2.70). Die oben erhaltenen Mutterlaugen werden vereinigt und mit NaOH alkalisch gemacht. Man extrahiert 3 x mit 30 ml CHCl_3 , trocknet über Na_2SO_4 und rotiert im Vakuum das Lösungsmittel ab. Der Rückstand wird in 30 ml Wasser mit 3,50 g (23,3 mMol) D(-)-Weinsäure kurz zum Sieden erhitzt. Beim Erkalten kristallisiert das D(-)-Tartrat des (+)-ÄDA aus, das nochmals mit 20 ml Wasser umkristallisiert wird. Das Salz wird wie oben aufgearbeitet (Subst. Nr. 2.71).

1.22. Verfahren zur Herstellung von optisch aktiven
N,N'-Dibutyryl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin

1,9 g (6,97 mMol) Subst. Nr. 2.70 bzw. 2.71 wird zusammen mit 2,2 g Triäthylamin (wasserfrei) in 50 ml wasserfreien Äther suspendiert. (Zweihalskolben, Rückflußkühler mit CaCl_2 -Rohr, Tropftrichter, Magnetrührer) Man tropft unter Rühren langsam eine Lösung von 2,23 g Buttersäurechlorid in 20 ml wasserfreien Äther zu und kocht über Nacht am Rückfluß. Der weiße Niederschlag bestehend aus Triäthylamin:HCl und N,N'-Dibutyryl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin wird abgesaugt 3 x mit 20 ml Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

1.23. Verfahren zur Herstellung von optisch aktivem N,N'-Di-butyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin

2,5 g LiAlH_4 (= 60 mmol) werden in einem Dreihalskolben mit Rückflußkühler und Tropftrichter (CaCl_2 -Rohr) in 100 ml wasserfreiem Äther suspendiert. Unter Rühren tropft man nun langsam eine Suspension von ButyrylADA/Triäthylamin.HCl-Gemisch (entsprechend ca. 5,87 mmol Säureamid) in 50 ml wasserfreiem Äther zu. Man kocht 12 Stunden am Rückfluß und tropft dann langsam unter Kühlung zuerst 5 ml Wasser, dann 5 ml 3N NaOH und dann wiederum 10 ml H_2O zu. Die wässrige Phase wird 3 x mit Äther extrahiert, das Lösungsmittel der vereinigten Auszüge abgezogen, der Rückstand in CHCl_3 aufgenommen und die Lösung mit 20 ml 3N HCl durchgeschüttelt. Die Chloroformphase wird über Na_2SO_4 getrocknet, abgezogen und die gewonnenen Dihydrochloride in Methanol/Äther umkristallisiert.

D. 2. Verbindungen

- 2.1. 5-Chlor-2-methoxybenzaldehyd nach Verfahren 1.2. (3)
 Farblose Kristalle Schmp. = 81°C (Äthanol)
 Ausbeute: 88,1% d.Th. $C_8H_7ClO_2$ (170,6)
- 2.2. 6-Chlor-3-methoxybenzaldehyd nach Verfahren 1.2. (3)
 Farbloses Öl Sdp.₁₂ = 139°C
 Schmp. = 63°C (Äthanol)
 Ausbeute: 69,5% d.Th.
- 2.3. 3-Chlor-4-methoxybenzaldehyd nach Verfahren 1.2. (3)
 Farbloses Öl Sdp.₁₂ = 145°C
 Schmp. = 62°C (Äthanol)
 Ausbeute: 80,0% d.Th.
- 2.4. 5-Chlor-2-hydroxybenzaldehyd nach Verfahren 1.2. (3)
 Farblose Kristalle Schmp. = 100°C (Essig-
 säure)
 Ausbeute: 81% d.Th. $C_7H_5ClO_2$ (156,6)
- 2.5. 6-Chlor-3-hydroxybenzaldehyd nach Verfahren 1.2. (3)
 beige Kristalle Schmp. = 155°C (Chloro-
 form)
 Ausbeute: 75,5% d.Th. $C_7H_5ClO_2$ (156,6)
- 2.6. 3-Chlor-4-hydroxybenzaldehyd nach Verfahren 1.2. (3)
 beige Kristalle Schmp. = 105°C (Chloro-
 form)
 Ausbeute: 88,0% d.Th. $C_7H_5ClO_2$ (156,6)

2.7. 3-Chlor-4-benzyloxybenzaldehyd nach Verfahren 1.2.*

Farblose Kristalle Schmp. = 87°C (90% Essigsäure)

Ausbeute: 78,5% d.Th. $C_{14}H_{11}O_2Cl$ (247,5)

Ber.: C 67,94 H 4,48

Gef.: C 67,80 H 4,11

NMR ($CDCl_3$) δ 9,7 (s 1H, $-\underline{CH=}$); 8,05-7,14 (m 8 arom. H); 5,35 (s 2H, $-\underline{O-CH_2-}$)

* Der Ausgangsaldehyd wird in der doppelten Menge 90% Essigsäure wie bei Verfahren 1.2. gelöst. Die Temperatur im Reaktionsgefäß muß zwischen 30 und 40°C gehalten werden.

2.8. 5-Chlor-2-methoxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.

gelbes Öl Sdp._{0,01} = 128°CAusbeute: 96,6% d.Th. $C_{12}H_{16}ClNO$ (225,7)

Ber.: C 63,85 H 7,15 N 6,21

Gef.: C 63,62 H 7,09 N 6,10

NMR (./.) δ 8,56 (s 1H, $-\underline{CH=}$); 8,00-6,53 (m 3 arom. H); 3,66 (s 3H, $-\underline{O-CH_3}$); 3,63-0,78 (m 9H, = $N-C_4H_9$)

2.9. 6-Chlor-3-methoxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.

gelbes Öl Sdp.₁₀ = 159°CAusbeute: 93,0% d.Th. $C_{12}H_{16}ClNO$ (225,7)

Ber.: C 63,85 H 7,15 N 6,21

Gef.: C 63,87 H 7,07 N 6,19

NMR (./.) δ 8,73 (s 1H, $-\underline{CH=}$); 7,65-6,66 (m 3 arom. H); 3,70 (s 3H, $-\underline{O-CH_3}$)

2.10. 3-Chlor-4-methoxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.

hellgelbes Öl Sdp.₁₂ = 178°CAusbeute: 95 % d.Th. $C_{12}H_{16}ClNO$ (225,7)

Ber.: C 63,85 H 7,15 N 6,21

Gef.: C 63,85 H 7,07 N 6,15

NMR (./.) δ 8,05 (s 1H, $-\underline{CH=N}$); 7,80-6,68 (m 3 arom. H); 3,76 (s 3H, $-\underline{O-CH_3}$); 3,63-0,83 (m 9H, = $N-C_4H_9$)

2.11. 5-Chlor-2-hydroxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.

gelbes Öl Sdp.₁₀ = 157 - 160°C
 Ausbeute: 87,5% d.Th. C₁₁H₁₄ClNO (211,4)
 Ber.: C 62,41 H 6,66 N 6,61
 Gef.: C 62,33 H 6,59 N 6,41
 NMR (./.) δ 13,3 (s 1H D₂O, Ar-OH); 8,05 (s 1H, N=CH-)
 7,26-6,73 (m 3 arom.H); 3,51-0,90 (m 9H, =N-C₄H₉)

2.12. 6-Chlor-3-hydroxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.

rötlichbraunes Öl Sdp. 0,01° O 182°C (zs)
 Ausbeute: ca. 70% d.Th. C₁₁H₁₄ClNO (211,6)
 NMR (./.) δ 8,33 (s 1H, -CH=); 7,76 (breites s 1H, D₂O, Ar-OH); 7,16-6,23 (m 3 arom.H); 3,40-0,58 (m 9H, =N-C₄H₉)

2.13. 3-Chlor-4-hydroxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.

rötlichbraunes Öl Sdp. 0,0 O 110°C (zs)
 Ausbeute: ca. 35% d.Th. C₁₁H₁₄ClNO (211,6)

Verbindungen 2.12. und 2.13. sind nicht destillierbar und werden als Rohprodukte weiterverarbeitet.

2.14. 2-Methoxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.

farbloses Öl Sdp.₁₀ = 142 - 145°C
 Ausbeute: 86,5% d.Th. C₁₂H₁₇NO (191,3)
 Ber.: C 75,35 H 8,96 N 7,32
 Gef.: C 75,26 H 8,92 N 7,32
 NMR (./.) δ 8,8 (s 1H, N=CH-); 8,23-6,63 (m 4 arom. H);
 3,61 (s 3H, O-CH₃); 3,62-0,93 (m 9H, N-C₄H₉)

2.15. 3-Methoxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.

farblose ölige Flüssigkeit Sdp.₁₀ = 139°C
 Ausbeute: 91,0% d.Th. C₁₂H₁₇NO (191,3)
 Ber.: C 75,35 H 8,96 N 7,32
 Gef.: C 74,85 H 8,91 N 7,26
 NMR (./.) δ 8,1 (s 1H, N=CH-); 7,43-6,76 (m 4 arom. H);
 3,61 (s 3H, O-CH₃); 3,62-0,80 (m 9H, N-C₄H₉)

- 2.16. 4-Methoxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.
 farbloses Öl Sdp.₁₀ = 145°C
 Ausbeute: 92,5% d.Th. C₁₂H₁₇NO (191,3)
 Ber.: C 75,35 H 8,96 N 7,32
 Gef.: C 75,02 H 8,79 N 7,22
 NMR (./.) δ 8,06 (s 1H, N=CH-); 7,73-6,73 (m 4 arom.H);
 3,56 (s 3H, O-CH₃); 3,59-0,73 (m 9H, N-C₄H₉)
- 2.17. 2-Hydroxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.
 hellgelbes Öl Sdp.₁₀ = 132°C
 Ausbeute: 79,5% d.Th. C₁₁H₁₅NO (177,3)
 Ber.: C 74,54 H 8,53 N 7,90
 Gef.: C 72,98 H 7,89 N 7,72
 NMR (./.) δ 13,43 (breites s 1H D₂O, Ar-OH); 8,08 (s 1H,
 N=CH-); 7,36-6,6 (m 4 arom.H); 3,43-0,73 (m 9H, N-C₄H₉)
- 2.18. 3-Hydroxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.
 farblose Kristalle Schmp. = 119°C (Chloroform)
 Ausbeute: 62,0% d.Th. C₁₁H₁₅NO (177,3)
 Ber.: C 74,54 H 8,53 N 7,90
 Gef.: C 73,80 H 8,33 N 7,94
 NMR (CDCl₃) δ 8,43 (s 1H, Ar-OH); 8,1 (s 1H, N=CH-);
 7,31-6,86 (m 4 arom.H); 3,75-0,95 (m 9H, N-C₄H₉)
- 2.19. 4-Hydroxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.
 Die Substanz konnte weder durch Destillation noch durch
 Kristallisation isoliert werden. Chromatographisch
 konnte festgestellt werden, daß es sich um ein Vielkompo-
 nentengemisch handelt.
- 2.20. 4-Methoxybenzylidenmethylamin nach Verfahren 1.3. (5)
 gelbes Öl Sdp.₁₂ = 118°C
 Ausbeute 82% C₉H₁₁NO (149,2)
 NMR δ 8,0 (s 1H, N=CH-); 7,68-7,84 (d 4H arom.);
 3,87 (s 3H, O-CH₃); 3,14 (s 3H, N-CH₃)

- 2.21. 4-Methoxybenzylidenäthylamin nach Verfahren 1.3.
 hellgelbes Öl $\text{Sdp.}_{12} = 112^\circ\text{C}$
 Ausbeute: 47,5% d.Th. $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N} = (163,2)$
 Ber.: C 73,58 H 8,03 N 8,58
 Gef.: C 73,41 H 7,99 N 8,52
 $^1\text{H NMR}$ (./.) δ 8,05 (s 1H, $\text{N}=\text{CH}-$); 7,85-6,72 (m 4 arom. H);
 3,85 (s 3H, $\text{O}-\text{CH}_3$); 3,03-1,25 (m 5H, $\text{N}-\text{C}_2\text{H}_5$)
- 2.22. 4-Methoxybenzyliden-n-propylamin nach Verfahren 1.3. (5)
 gelbes Öl $\text{Sdp.}_{12} = 123 - 125^\circ\text{C}$
 Ausbeute: 93,0% d.Th. $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO} (177,2)$
 NMR (./.) δ 8,1 (s 1H, $\text{N}=\text{CH}-$); 7,9-6,7 (m 4 arom. H);
 4,0 (s 3H, $\text{O}-\text{CH}_3$); 0,8-3,2 (m 7H, $\text{N}-\text{C}_3\text{H}_7$)
- 2.23. 4-Methoxybenzyliden-isopentylamin nach Verfahren 1.3.
 farbloses Öl $\text{Sdp.}_1 = 125^\circ\text{C}$
 Ausbeute: 87,0% d.Th. $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO} (205,3)$
 Ber.: C 76,05 H 9,32 N 6,82
 Gef.: C 75,85 H 9,30 N 6,77
 NMR (./.) δ 8,08 (s 1H, $\text{N}=\text{CH}-$); 7,73-6,73 (m 4 arom. H);
 3,6 (s 3H, $\text{O}-\text{CH}_3$); 3,55-0,93 (m 11H, $\text{N}-\text{C}_5\text{H}_{11}$)
- 2.24. 4-Methoxybenzyliden-n-pentylamin nach Verfahren 1.3.
 farbloses Öl $\text{Sdp.}_1 = 122^\circ\text{C}$
 Ausbeute: 84,0% d.Th. $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO} (205,3)$
 Ber.: C 76,05 H 9,32 N 6,82
 Gef.: C 75,88 H 9,22 N 6,80
 NMR (./.) δ 8,11 (s 1H, $\text{N}=\text{CH}-$); 7,81-6,79 (m 8 arom. H);
 3,75 (s 3H, $\text{O}-\text{CH}_3$); 3,60-0,98 (m 11H, $\text{N}-\text{C}_5\text{H}_{11}$)
- 2.25. 4-Methoxybenzyliden-n-hexylamin nach Verfahren 1.3.
 farbloses Öl $\text{Sdp.}_{12} = 170^\circ\text{C}$
 Ausbeute: 79,0% d.Th. $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{NO} (219,3)$
 Ber.: C 76,6 H 9,65 N 6,38
 Gef.: C 76,3 H 9,44 N 6,36
 NMR (./.) δ 8,00 (s 1H, $\text{N}=\text{CH}-$); 7,66-6,70 (m 4 arom. H);
 3,66 (s 3H, $\text{O}-\text{CH}_3$); 3,50-0,91 (m 13H, $\text{N}-\text{C}_6\text{H}_{13}$)

- 2.26. 4-Benzyloxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.
 farbloses Öl $\text{Sdp.}_1 = 190 - 192^\circ\text{C}$
 Ausbeute: 92,0% d.Th. $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}$ (267,6)
- 2.27. 4-Benzyloxybenzyliden-n-pentylamin nach Verfahren 1.3.
 farbloses Öl $\text{Schmp.} = 49^\circ\text{C}$
 Ausbeute: 75,0% d.Th. $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}$ (281,4)
 Ber.: C 81,09 H 8,23 N 4,97
 Gef.: C 81,02 H 8,20 N 4,89
 NMR (CDCl_3) δ 8,23 (s 1H, $\text{N}=\text{CH}-$); 7,80-6,93 (m 9 arom.H);
 5,1 (s 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-$); 3,66-0,90 (m 11H, $\text{N}-\text{C}_5\text{H}_{11}$)
- 2.28. 4-Benzyloxybenzylidenhexylamin nach Verfahren 1.3.
 farbloses Öl $\text{Sdp.}_1 = 220^\circ\text{C}$ (zs)
 Ausbeute: ca. 70,0% d.Th. $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{NO}$ (307,4)
 Die Schiffsche Base ist nicht destillierbar und wurde
 als Rohprodukt zur Reduktion eingesetzt.
 NMR (./.) δ 8,0 (s 1H, $\text{N}=\text{CH}-$); 7,66-6,70 (m 9 arom.H);
 4,73 (s 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-$); 3,55-0,88 (m 13H, $\text{N}-\text{C}_6\text{H}_{13}$)
- 2.29. 4-Benzyloxy-3-chlorbenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.3.
 gelbes Öl $\text{Sdp.}_{0,1} = 165^\circ\text{C}$
 Ausbeute: 73,0% d.Th. $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{NOCl}$ (302,8)
 Ber.: C 71,39 H 6,65 N 4,62
 Gef.: C 70,81 H 6,61 N 4,62
 NMR (CDCl_3) δ 8,26 (s 1H, $\text{N}=\text{CH}-$); 8,0-7,0 (m 8 arom.H);
 5,25 (s 2H, $\text{O}-\text{CH}_2-$); 3,75-0,86 (m 9H, $\text{N}-\text{C}_4\text{H}_9$)
- 2.30. Reduktion von 5-chlor-2-methoxybenzyliden-
 butylamin nach Verfahren 1.4./1.6./1.9.

- 2.30.a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(5'-chlor-2'-methoxyphenyl)-
äthylendiamindihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 215° (Methanol/Äther)
Ausbeute: 17,1% d.Th. $C_{24}H_{34}Cl_2N_2O_2 \times 2HCl$ (526,4)
Ber.: C 54,76 H 6,89 N 5,32
Gef.: C 54,40 H 6,95 N 4,95
NMR ($CDCl_3$) δ 7,46-6,76 (m 6 arom.H) 5,23 (s 2H, N-CH $\leq$);
3,86 (s 6H, O-CH $\underline{3}$); 2,80-0,76 (m 18H, N-C $\underline{4}H_9$)
- 2.30.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(5'-chlor-2'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 205°C (Methanol/Äther)
Ausbeute: 28,5% d.Th. $C_{24}H_{34}Cl_2N_2O_2 \times 2HCl$ (526,4)
Ber.: C 54,76 H 6,89 N 5,32
Gef.: C 54,75 H 6,84 N 5,05
NMR ($CDCl_3$) δ 7,56-6,83 (m 6 arom. H);
5,5 (breites s 2H, N-CH $\leq$); 2,83-0,76 (m 18H, N-C $\underline{4}H_9$)
- 2.30.c. 5-Chlor-2-methoxybenzylbutylamin-hydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 145°C (Methanol/Äther)
Ausbeute: 16,2% d.Th. $C_{12}H_{18}ClNO \times HCl$ (264,2)
NMR ($CDCl_3$) δ 7,60-6,80 (m 3 arom.H); 4,06 (d 2H, J=7,0
Hz, N-CH $\underline{2}$ -); 3,93 (s 3H, O-CH $\underline{3}$); 2,96-0,80 (m 9H, N-C $\underline{4}H_9$)
- 2.31. Reduktion von 6-Chlor-3-methoxybenzylidenbutylamin
nach Verfahren 1.4./1.6./1.9.
- 2.31.a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(6'-chlor-3'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 238°C (Äthanol/Äther)
Ausbeute: 9,7% d.Th. $C_{24}H_{34}Cl_2N_2O_2 \times 2HCl$ (526,4)
Ber.: C 54,76 H 6,89 N 5,32
Gef. C 54,55 H 6,89 N 5,32
NMR als Base ($CDCl_3$) δ 7,16-6,43 (m 6 arom.H);
4,4 (s 2H, N-CH $\leq$); 3,7 (s 6H, O-CH $\underline{3}$); 2,46-0,83
m 18H, N-C $\underline{4}H_9$)

2.31.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(6'-chlor-3'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 229°C (Methanol/Äther)
Ausbeute: 16,5% d.Th. $C_{24}H_{34}Cl_2N_2O_2 \times 2HCl$ (526,4)
Ber.: C 54,76 H 6,89 N 5,32
Gef.: C 54,77 H 6,79 N 5,33
NMR ($CDCl_3$) δ 7,73-6,86 (m 6 arom.H);
5,56 (s 2H, N-CH $\leq$); 3,83 (s 6H, O-CH $\underline{3}$); 3,13-0,94
(m 18H, N-C $\underline{4}H_9$)

2.31.c 6-Chlor-3-methoxybenzylbutylamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 148°C (Methanol/Äther)
Sdp. (10) Base = 159°C
Ausbeute: 9,5% d.Th. C H ClNOxHCl (264,2)
12 18
Ber.: C 54,56 H 7,25 N 5,30
Gef. C 54,55 H 7,19 N 5,29
NMR (%) als Base 7,1-6,58 (m 3 arom.H); 5,28 (s 2H,
N-CH $\underline{2}$ -) 3,66 (s 3H, O-CH $\underline{3}$); 3,58-0,93; (m 9H, N-C $\underline{4}H_9$)

2.32. Reduktion von 3-Chlor-4-methoxybenzylidenbutylamin
nach Verfahren 1.4./1.6./1.9.

2.32.a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3'-chlor-4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 219 - 225°C (zs)
Ausbeute: 12,4% d.Th. $C_{24}H_{34}Cl_2N_2O_2 \times 2HCl$ (526,4)
Ber.: C 54,76 H 6,89 N 5,32
Gef.: C 54,70 H 6,71 N 5,31
NMR (CD_3OD) δ 7,5-7,03 (m 6 arom.H);
5,26 (s 2H, N-CH $\leq$); 3,93 (s 6H, O-CH $\underline{3}$); 3,23-0,86
(m 18H, N-C $\underline{4}H_9$)

2.32.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3'-chlor-4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid

farblose Kristalle Schmp. = 214°C (Äthanol/Äther)

Ausbeute: 21,0% d.Th. $C_{24}H_{34}Cl_2N_2O_2 \times 2HCl$ (526,4)

Ber.: C 54,76 H 6,89 N 5,32

Gef.: C 54,74 H 6,88 N 5,37

NMR (CD_3OD) δ 7,83-7,00 (m 6 arom.H);

5,13 (s 2H, N-CH₂); 4,01 (s 6H, O-CH₃); 2,86-0,76
(m 18H, N-C₄H₉)

2.32.c 3-Chlor-4-methoxybenzyläthylamin-dihydrochlorid⁺

farblose Kristalle Schmp. = 209°C (Äthanol)

Ausbeute: 12,5% d.Th. $C_{12}H_{18}ClNO \times HCl$ (264,2)

Ber.: C 54,56 H 7,25 N 5,30

Gef.: C 54,74 H 7,21 N 5,33

NMR (CD_3OD) δ 7,6-7,03 (m 3 arom.H); 4,13 (s 2H, N-CH₂);
3,88 (s 3H, O-CH₃); 3,13-0,8 (m 9H, N-C₄H₉)

⁺Das Monomerprodukt ist als Base nicht destillierbar.
Es wird aus dem Rphprodukt als Hydrochlorid als 1.Frak-
tion in Methanol/Äther gefällt.

2.33. Reduktion von 2-Methoxybenzylidenbutylamin nach
Verfahren 1.4./1.6./1.11.

2.33.a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2'-methoxyphenyl)-äthylen-
diamin-dihydrochlorid

beige Kristalle Schmp. = 175°C (Methanol/Äther)

Ausbeute: 14,2% d.Th. $C_{24}H_{36}N_2O_2 \times 2HCl$ (457,5)

Ber.: C 63,01 H 8,37 N 6,13

Gef.: C 62,88 H 8,34 N 6,11

NMR (CD_3OD) δ 7,33-6,86 (m 8 arom.H); 5,33 (s 2H,

N-CH₂); 3,95 (s 6H, O-CH₃); 3,0-0,96 (m 18H, N-C₄H₉)

2.33.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2'-methoxyphenyl)-äthylen-diamin-dihydrochlorid

farbloses Kristallpulver Schmp. = 190°C (Methanol/Äther)

Ausbeute: 20,0% d.Th. $C_{24}H_{36}N_2O_2$ (457,5)

Ber.: C 63,01 H 8,37 N 6,10

Gef.: C 63,00 H 8,38 N 6,04

NMR (CD_3OD) δ 7,40-6,86 (m 8 arom.H); 4,9 (s 2H, N-CH<); 3,66 (s 6H, O-CH₃); 2,83-0,95 (m 18H, N-C₄H₉)

2.33.c 2-Methoxybenzylbutylaminhydrochlorid

farblose Kristallplättchen Schmp. = 101°C (Äthanol)

Sdp. 0,01 (Base) = 110°C

Ausbeute: 16.2% d.Th. $C_{12}H_{19}NO \cdot HCl$ (229,7)

Ber.: C 62,73 H 8,78 N 6,10

Gef.: C 62,71 H 8,76 N 6,02

NMR ($CDCl_3$) δ 7,66-6,86 (m arom.H); 4,13 (6, 2H, J=7Hz, N-CH₂-); 3,93 (s 3H, O-CH₃); 2,93-0,78 (m 9H, N-C₄H₉)

2.34. Reduktion von 3-Methoxybenzylidenbutylamin
nach Verfahren 1.4./1.6./1.11.

2.34.a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3'-methoxyphenyl)-äthylen-diamin-dihydrochlorid

farblose Kristalle Schmp. = 181°C (Methanol/Äther)

Ausbeute: 9,5% d.Th. $C_{24}H_{36}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (457,5)

Ber.: C 63,01 H 8,37 N 6,13

Gef.: C 62,92 H 8,38 N 6,01

NMR ($CDCl_3$) δ 7,50-6,86 (m 8 arom.H); 4,90 (s 2H, N-CH<); 3,80 (s 6H, O-CH₃); 2,7-0,83 (m 18H, N-C₄H₉)

2.34.b. meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3'-methoxyphenyl)-äthylen-
diamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 180°C (Methanol/Äther)
Ausbeute: 29,5% d.Th. $C_{24}H_{36}N_2O_2 \times 2HCl$ (457,7)
Ber.: C 63,01 H 8,37 N 6,13
Gef.: C 62,97 H 8,33 N 6,10
NMR ($CDCl_3$) δ 7,53-6,93 (m 8 arom.H);
5,1 (s 2H, N-CH₂); 3,83 (s 6H, O-CH₃); 2,86-0,83 (m 18H,
N-C₄H₉)

2.34.c 3-Methoxybenzylbutylamin-hydrochlorid
silbrig glänzende Kristallplättchen
Schmp. = 156°C
Sdp. 0,01(Base) = 110°C
Ausbeute: 15,5% d.Th. $C_{12}H_{19}NO \times HCl$ (229,7)
Ber.: C 62,73 H 8,78 N 6,13
Gef.: C 62,70 H 8,76 N 6,10
NMR ($CDCl_3$) δ 7,36-6,83 (m 4 arom.H);
4,06 (s 2H, N-CH₂); 3,85 (s 3H, O-CH₃); 2,83-0,80
(m 9H, N-C₄H₉)

2.35. Reduktion von 4-Methoxybenzylidenbutylamin
nach Verfahren 1.4./1.6./1.11.

2.35.a. racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylen-
diamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 180°C (Methanol/Äther)
Ausbeute: 8,2% d.Th. $C_{24}H_{36}N_2O_2 \times 2HCl$ (457,5)
Ber.: C 63,01 H 9,37 N 6,13
Gef.: C 62,98 H 9,34 N 6,09
NMR ($CDCl_3$) δ 7,43-6,85 (m 8 arom.H); 4,83 (s 2H,
N-CH₂); 3,83 (s 6H, O-CH₃); 2,63-0,83 (m 18H, N-C₄H₉)

- 2.35.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylen-
diamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 194°C (Methanol/Äther)
Ausbeute: 22,0% d.Th. $C_{24}H_{36}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (457,5)
Ber.: C 63,02 H 8,37 N 6,13
Gef.: C 63,35 H 7,85 N 6,11
NMR ($CDCl_3$) δ 7,60-6,90 (m 8 arom.H); 5,05 (s 2H, N-CH₂); 3,83 (s 6H, O-CH₃); 2,83-0,83 (18H, N-C₄H₉)
- 2.35.c 4-Methoxybenzylbutylamin-hydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 197°C (Methanol/Äther)
Sdp. (Base)₁₀ = 160°C
Ausbeute: 22,0% d.Th. $C_{12}H_{19}NO \cdot HCl$ (229,7)
Ber.: C 62,73 H 8,78 N 6,13
Gef.: C 62,60 H 7,93 N 6,08
NMR ($CDCl_3$) δ 7,66-6,83 (m 4 arom.H); 4,00 (s 2H, N-CH₂); 4,00 (s 2H, N-CH₂); 3,73 (s 3H, O-CH₃); 2,76-0,78 (m 9H, N-C₄H₉)
- 2.36. Reduktion von 4-Methoxybenzylidenmethylamin
nach Verfahren 1.4. (5)
- 2.36.a racem-N,N'-Dimethyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
- 2.36.b meso-N,N'-Dimethyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
- 2.36.c 4-Methoxybenzylmethylamin-hydrochlorid
- 2.37. Reduktion von 4-Methoxybenzylidenäthylamin
nach Verfahren 1.4. (5)
- 2.37.a racem-N,N'-Diäthyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid

- 2.37.b meso-N,N'-Diäthyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
- 2.37.c 4-Methoxybenzyläthylamin-hydrochlorid
- 2.38. Reduktion von 4-Methoxybenzyliden-n-propyl- (5)
amin nach Verfahren 1.4./1.6.
- 2.38.a racem-N,N'-Di-n-propyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
- 2.38.b meso-N,N'-Di-n-propyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
- 2.38.c 4-Methoxybenzyl-n-propylamin-hydrochlorid
- 2.39 Reduktion von 4-Methoxybenzylidenisopropylamin
nach Verfahren 1.4./1.6. (5)
- 2.39.a racem-N,N'-Diisopropyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
- 2.39.b meso-N,N'-Diisopropyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
- 2.39.c 4-Methoxybenzylisopropylamin-hydrochlorid
- 2.40. Reduktion von 4-Methoxybenzylidenpentylamin
nach Verfahren 1.4./1.6./1.9.
- 2.40.a racem-N,N'-Di-n-pentyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
farbloses Kristallpulver Schmp. = 202°C (Methanol)
Ausbeute: 28,0% d.Th. $C_{26}H_{40}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (485,5)
- Ber.: C 64,32 H 8,72 N 5,77
Gef.: C 64,10 H 8,66 N 5,74
- NMR (CD_3OD) δ 7,43-6,80 (m 8 arom.H); 5,18 (s 2H,
N-CH₂); 3,77 (s 6H, O-CH₃); 3,20-0,67 (m 22H, N-C₅H₁₁)

- 2.40.b meso-N,N'-Di-n-pentyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
farbloses Kristallpulver Schmp. = 208 - 211°C (Methanol)
Ausbeute: 26,0% d.Th. $C_{26}H_{40}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (485,5)
Ber.: C 64,32 H 8,72 N 5,77
Gef.: C 64,80 H 8,81 N 5,74
NMR (CD_3OD) δ 7,93 - 7,12 (m 8 arom.H); 5,20 (s 2H,
N-CH₂-); 3,93 (s 6H, O-CH₃); 2,78-0,73 (m 22H, N-C₅H₁₁)
- 2.40.c 4-Methoxybenzyl-n-pentylamin
farbloses Öl Sdp.₁ = 115°C
Ausbeute: 33,0% d.Th. $C_{13}H_{21}NO$ (207,3)
Ber.: C 75,32 H 10,21 N 6,76
Gef.: C 75,11 H 9,98 N 6,74
NMR (CD_3OD) δ 7,60-6,93 (m 4 arom.H); 4,33 (s 2H,
N-CH₂-); 3,73 (s 3H, O-CH₃); 3,20-0,83 (m 11H, N-C₅H₁₁)
- 2.41. Reduktion von 4-Methoxybenzylidenisopentylamin
nach Verfahren: 1.4./1.6./1.9.
- 2.41.a racem N,N'-Diisopentyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
farbloses Kristallpulver Schmp. = 200°C (Methanol/Äther)
Ausbeute: 21,0% d.Th. $C_{26}H_{40}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (485,5)
Ber.: C 64,32 H 8,72 N 5,77
Gef.: C 64,22 H 8,88 N 5,74
NMR (CD_3OD) δ 7,43-6,87 (m 8 arom.H); 5,2 (s 2H,
N-CH₂-); 3,82 (s 6H, O-CH₃); 3,17-0,83 (m 22H, N-C₅H₁₁)
- 2.41.b meso N,N'-Diisopentyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 223 - 226°C (MeOH/Äther)
Ausbeute: 28,0% d.Th. $C_{26}H_{40}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (485,5)
Ber.: C 64,32 H 8,72 N 5,77
Gef.: C 63,98 H 8,74 N 5,78

NMR δ 7,87-7,13 (m 8 arom.H); 5,08 (s 2H, N-CH $\leq$);
3,93 (s 6H, O-CH $\underline{3}$); 2,83-0,67 (m 22H, N-C $\underline{5H_{11}}$)

2.41.c 4-Methoxybenzylisopentylamin

farblose Flüssigkeit Schmp. (1) = 117°C
Ausbeute: 31,0% d.Th. C $\underline{13H_{21}NO}$ (207,3)
Ber.: C 75,31 H 10,21 N 6,76
Gef.: C 74,98 H 10,19 N 6,77

2.42. Reduktion von 4-Methoxybenzylidenhexylamin
nach Verfahren 1.4./1.6./1.9.

2.42.a racem-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'methoxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid

farblose Kristalle Schmp. = 191°C (Äthanol)
Ausbeute: 18,0% d.Th. C $\underline{28H_{44}N_2O_2}$ (513,6)
Ber.: C 65,48 H 9,03 N 5,45
Gef. C 65,44 H 9,00 N 5,43
NMR (CD $\underline{3OD}$) δ 7,43-6,80 (m 8 arom.H); 5,10 (s 2H,
N-CH $\leq$); 3,87 (s 6H, O-CH $\underline{3}$); 2,80-0,83 (m 26H, N-C $\underline{6H_{13}}$)

2.42.b meso-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'methoxyphenyl)
äthylendiamin-dihydrochlorid

farblose Kristalle Schmp. = 128 - 130°C (Methanol)
Ausbeute: 17,0% d.Th. C $\underline{28H_{44}N_2O_2 \cdot 2HCl}$ (513,6)
Ber.: C 75,31 H 10,21 N 6,76
Gef.: C 74,89 H 10,20 N 6,78
NMR (CD $\underline{3OD}$) δ 7,87-7,07 (m 8 arom.H); 5,13 (s 2H, N-CH $\leq$);
3,87 (s 6H, O-CH $\underline{3}$); 2,88-0,78 (m 26H, N-C $\underline{6H_{13}}$)

2.42.c. 4-Methoxybenzylhexylamin-hydrochlorid

farblose Kristalle Schmp. = 221°C (Methanol/Äther)
Ausbeute: 21,0% d.Th. C $\underline{14H_{23}NO \cdot HCl}$ (257,8)
Ber.: C 65,23 H 9,38 N 5,43
Gef.: C 65,22 H 9,34 N 5,40

NMR (CD_3OD) δ 7,60-6,93 (m 4 arom.H); 4,17 (s 2H, N-CH₂-); 3,83 (s 3H, O-CH₃); 3,20-0,93 (13 H, N-C₆H₁₃)

2.43 Reduktion von 5-Chlor-2-hydroxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.4./1.7./1.10.

2.43.a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(5'-chlor-2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

farblose Kristalle Schmp. (Base) = 118°C (Äther)

Ausbeute: 7,2% d.Th. $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ (425,4)

Darstellung aus dem Dimethyläther nach Verfahren

D. 1.12

Ausbeute: 89,0% d.Th. (bezogen auf Ätherverbindung)

Ber.: C 62,11 H 7,10 N 6,58

Gef.: C 61,98 H 7,04 N 6,49

NMR (Base in CDCl_3) δ 7,26-6,80 (m 6 arom.H)

3,86 (s 2H, N-CH₂-); 2,50-0,76 (m 18H, N-C₄H₉)

2.43.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(5'-chlor-2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid

farblose Kristalle Schmp. (Base) = 141°C (Äther)

Ausbeute: 28,5% d.Th. $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2$ (425,4)

Darstellung aus dem Dimethyläther nach Verfahren

D.1.12.

Ausbeute: 94,0% d.Th. (bezogen auf Ätherverbindung)

Ber.: C 62,11 H 7,1 N 6,58

Gef.: C 62,14 H 6,99 N 6,51

NMR (Base in CDCl_3) δ 7,38-6,78 (m 6 arom.H);

3,86 (s 2H, N-CH₂-); 2,46-0,80 (m 18H, N-C₄H₉);

2.43.c 5-Chlor-2-hydroxybenzylbutylamin

farblose Kristalle Schmp. (Base) = 130°C (Äther)

Ausbeute: 3,1% d.Th. $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{ClNO}$ (213,7)

Ber.: C 61,82 H 7,54 N 6,55
 Gef.: C 61,89 H 7,54 N 6,53
 NMR (CD₃OD) δ 7,43-6,86 (m 3 arom.H);
 4,20 (s 2H, N-CH₂-); 3,16-0,83 (m 9H, N-C₄H₉)

2.44. Reduktion von 6-chlor-3-hydroxybenzyliden-
 butylamin nach Verfahren 1.4./1.7./1.10.

2.44.a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(6'-chlor-3'-hydroxy-
 phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 179°C (Methanol/Äther)
 Ausbeute: 12,0% d.Th. C₂₂H₃₀Cl₂N₂O₂·2HCl (498,3)
 Darstellung aus dem Dimethyläther nach Verfahren D 1.12.
 Ausbeute: 79% d.Th. (bezogen auf Ätherverbindung)
 Ber.: C 53,02 H 6,47 N 5,62
 Gef.: C 53,10 H 6,44 N 5,60
 NMR (CDCl₃) δ 7,40-6,70 (m 6 arom.H); 4,40 (s 2H, D₂O,
 Ar-OH); 3,93 (s 2H, N-CH₂-); 2,90-0,76 (m 18H, N-C₄H₉)

2.44.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(6'-chlor-3'-hydroxyphenyl)-
 äthylendiamin-dihydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 189°C (Methanol/Äther)
 Ausbeute: 10,0% d.Th. C₂₂H₃₀Cl₂N₂O₂·2HCl (498,3)
 Darstellung aus dem Dimethyläther nach dem Verfah-
 ren D. 1.12.
 Ausbeute: 88,0% d.Th. (bezogen auf Ätherverbindung)
 Ber.: C 53,02 H 6,47 N 5,62
 Gef.: C 52,88 H 6,47 N 5,63
 NMR (CDCl₃) δ 7,63-6,88 (m 6 arom.H); 4,70 (s 2H, D₂O,
 Ar-OH); 3,84 (s 2H, N-CH₂-); 2,88-0,74 (m 18H, N-C₄H₉)

2.44.c 6-Chlor-3-hydroxybenzylbutylamin-hydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 174°C (Methanol/Äther)
 Ausbeute: 11,0% d.Th. C₁₁H₁₆ClNO·HCl (250,2)
 Ber.: C 52,81 H 6,85 N 5,59
 Gef.: C 52,74 H 6,05 N 5,55

NMR (CDCl_3) δ 7,13-6,73 (m 3 arom.H); 5,26 (s 1H, D_2O , Ar-OH); 3,93 (s 2H, N-CH₂-); 2,83-0,93 (m 9H, N-C₄H₉)

- 2.45. Reduktion von 3-Chlor-4-hydroxybenzylidenbutylamin nach Verfahren D.1.4. und D. 1.5. besteht das Reduktionsprodukt, durch DC-Untersuchung festgestellt, aus einem Vielkomponentengemisch, aus dem sich mit keinem der angegebenen Verfahren das entsprechende meso- bzw. racem-ÄDA isolieren läßt. Versuche zur Spaltung der entsprechenden Ätherverbindungen nach den Verfahren D. 1.12. bis D. 1.15. verliefen negativ.
- 2.45 Reduktion von 2-Hydroxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.4./1.7./1.10.
- 2.46.a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid
 hellbraune Kristalle Schmp. = 220°C (Äthanol/Äther)
 Ausbeute: 4,5% d.Th. $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2 \times 2\text{HCl}$ (429,4)
 Darstellung aus dem Dimethyläther nach Verfahren D. 1.12.
 Ausbeute: 92% d.Th. (bezogen auf Ätherverbindung)
 Ber.: C 61,40 H 7,97 N 6,52
 Gef.: C 61,32 H 7,90 N 6,39
 NMR (CD_3OD) δ 7,40-6,60 (m 8 arom.H);
 5,30 (s 2H, N-CH₂-); 3,13-0,76 (m 18H, N-C₄H₉)
- 2.46.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 208°C (Methanol/Äther)
 Ausbeute: 19,5% d.Th. Schmp. (Base) = 89°C (Äther)
 $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2 \times 2\text{HCl}$ (429,4)
 Darstellung aus dem Dimethyläther nach Verfahren D. 1.12.

Ausbeute: 96,0% d.Th. (bezogen auf Ätherverbindung)

Ber.: C 61,40 H 7,97 N 6,52

Gef.: C 60,78 H 7,88 N 5,51

NMR (CD₃OD) δ 7,66-6,90 (m 8 aromat.H);

5,30 (s 2H, N-CH₂); 3,06-0,73 (m 18H, N-C₄H₉)

2.46.c 2-Hydroxybenzylbutylamin-hydrochlorid

Chromatographisch in Spuren nachweisbar, aber nicht isolierbar.

2.47. Reduktion von 3-Hydroxybenzylidenbutylamin
nach Verfahren 1.4./1.7./1.10.

2.47. racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid

farblose Kristalle Schmp. = 208°C (Methanol/Äther)

Schmp. (Base) = 146°C (Chloroform)

Ausbeute: 5,7% d.Th. $C_{22}H_{32}N_2O_2 \times 2HCl$ (429,4)

Darstellung aus dem Dimethyläther nach Verfahren
1.12.

Ausbeute: 82,0% d.Th. (bezogen auf Ätherverbindung)

Ber.: C 61,40 H 7,97 N 6,52

Gef.: C 61,44 H 7,96 N 6,48

NMR (CD₃OD) δ 7,26-6,66 (m 8 aromat.H);

5,06 (s 2H, N-CH₂); 3,10-0,76 (m 18H, N-C₄H₉)

2.47.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(3'-hydroxyphenyl)-äthylen-
diamin-dihydrochlorid

farblose Kristalle Schmp. = 205°C (zs) (Äthanol/
Äther)

Ausbeute: 18,2% d.Th. $C_{22}H_{32}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (429,4)

Darstellung aus dem Dimethyläther nach Verfahren
D. 1.12.

Ausbeute: 87,0% d.Th. (bezogen auf Ätherverbindung)

Ber.: C 61,40 H 7,97 N 6,52
 Gef.: C 61,33 H 7,84 N 6,49
 NMR (CD_3OD) δ 7,56-6,95 (m 8 arom.H);
 5,00 (s 2H, N- CH_2 -); 2,93-0,73 (m 18H, N-C $\underline{\text{C}_4\text{H}_9}$)

2.47.c 3-Hydroxybenzylbutylamin

beige Kristalle Schmp. = 103°C (Äther)

Ausbeute: 16,2% d.Th. $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{NO}$ (179,26)

Ber.: C 73,70 H 9,55 N 8,92

Gef.: C 73,72 H 9,55 N 8,91

NMR (CD_3OD) δ 7,33-6,63 (m 4 arom.H);
 3,78 (s 2H, N- CH_2 -); 4,46-0,83 (m 9H, N-C $\underline{\text{C}_4\text{H}_9}$)

2.48 Reduktion von 4-Hydroxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.4. und 1.5.

Das Reduktionsprodukt besteht, durch DC-Untersuchung
festgestellt, aus einem Vielkomponentengemisch, aus
dem sich mit keinem der angegebenen Verfahren das ent-
sprechende meso- bzw. racem-ÄDA isolieren läßt.

2.48.a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylen- diamin-dihydrochlorid

farblose Kristalle Schmp. = 174°C (Methanol/Äther)

Darstellung aus dem Dimethyläther nach Verfahren D. 1.12.

Ausbeute: 87,5% (bezogen auf Ätherverbindung)

Darstellung aus dem Benzyläther nach Verfahren D. 1.13.

Ausbeute: 98,0% (bezogen auf Ätherverbindung)

$\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2 \times 2\text{HCl}$ (429,4)

Ber.: C 61,40 H 7,97 N 6,52

Gef.: C 61,32 H 7,88 N 6,50

NMR (CD_3OD) δ 7,33-6,70 (m 8 arom.H);
 5,10 (s 2H, N- CH_2 -); 3,1-0,76 (m 18H, N-C $\underline{\text{C}_4\text{H}_9}$)

- 2.48.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 225°C (Methanol/Äther)
 Darstellung aus dem Dimethyläther nach Verfahren D 1.12.
 Ausbeute: 92,0% (bezogen auf Ätherverbindung)
 Darstellung aus dem Dibenzyläther nach Verfahren D 1.13.
 Ausbeute: 99,0% (bezogen auf Ätherverbindung)
 $C_{22}H_{32}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (429,4)
 Ber.: C 61,40 H 7,97 N 6,52
 Gef.: C 60,98 H 7,96 N 6,50
 NMR (CD_3OD) δ 7,93-7,00 (m 8 arom.H.);
 5,13 (s 2H, N-CH₂); 2,90-0,70 (m 18H, N-C₄H₉)
- 2.49 Reduktion von p-Benzoyloxybenzylidenbutylamin nach Verfahren 1.5./1.6./1.9. (6)
- 2.49.a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-benzyloxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 101°C (Äthanol/Äther)
 Ausbeute: 21,0% d.Th. $C_{36}H_{44}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (609,6)
- 2.49.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-benzyloxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 205-208°C (Äthanol/Äther)
 Ausbeute: 36,0% d.Th. $C_{36}H_{44}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (609,6)
- 2.49.c. 4-Benzoyloxybenzylbutylamin-hydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 210°C (Äthanol/Äther)
 Ausbeute: 11,0% d.Th. $C_{18}H_{23}NO \cdot HCl$ (305,8)
- 2.50. Reduktion von 4-Benzoyloxybenzylidenpentylamin nach Verfahren 1.4./1.6./1.9.*
 *Rohbase nicht destillierbar.

2.50.a racem-N,N'-Dipentyl-1,2-di-(4'-benzyloxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 109°C (Chloroform/
Äther)
Ausbeute: 23,0% d.Th. $C_{38}H_{48}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (637,7)
Ber.: C 71,56 H 7,90 N 4,39
Gef.: C 70,22 H 7,96 N 4,29
NMR (CF_3COOD) δ 7,73-6,76 (m 18 arom.H); 5,30 (s 4H,
O-CH₂-); 4,36 (s 2H, N-CH<); 3,05-0,73 (m 22H, N-C₅H₁₁)

2.50.b meso-N,N'-Dipentyl-1,2-di-(4'-benzyloxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 199°C (Chloroform/
Äther)
Ausbeute: 26,0% d.Th. $C_{38}H_{48}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (637,7)
Ber.: C 71,56 H 7,90 N 4,39
Gef.: C 69,98 H 7,94 N 4,19
NMR (CF_3COOD) δ 8,16-7,26 (m 18 arom.H); 5,46 (s 4H,
O-CH₂-); 4,13 (s 2H, N-CH<); 3,23-0,66 (m 22H, N-C₅H₁₁)

2.50.c 4-Benzyloxybenzylpentylamin-hydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 205°C (Äthanol/Äther)
Ausbeute: 17,0% d.Th. $C_{19}H_{25}NO \cdot HCl$ (319,8)
Ber.: C 71,34 H 8,19 N 4,37
Gef.: C 71,14 H 7,79 N 4,36
NMR (CD_3OD) δ 7,63-7,00 (m 9 arom.H); 5,16 (s 2H, O-CH₂-)
4,16 (s 2H, N-CH₂-) 3,2-0,86 (m 11H, N-C₅H₁₁)

2.51. Reduktion von 4-Benzyloxybenzylidenhexylamin nach
Verfahren 1.4./1.6./1.9.*

2.51.a racem-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'-benzyloxyphenyl)-äthylen-
diamin-dihydrochlorid
farblose Kristalle Schmp. = 95-99°C (Methanol/
Äther)

*Rohbase nicht destillierbar

Ausbeute: 28,0% d.Th. $C_{40}H_{52}N_2O_2 \times 2HCl$ (665,8)
 Ber.: C 72,16 H 8,17 N 4,20
 Gef.: C 71,95 H 7,34 N 4,28
 NMR (CD_3OD) δ 7,56-6,83 (m 18 arom.H); 5,26 (s 2H, N-CH $\leq$); 5,06 (s 4H, O-CH $\underline{2}$ -); 3,23-0,76 (m 26H, N-C $\underline{6H_{13}}$)

- 2.51.b meso-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'-benzyloxyphenyl)-
 äthylendiamin-dihydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 99°C (Methanol)
 Ausbeute: 30,0% d.Th. $C_{40}H_{52}N_2O_2 \times 2HCl$ (665,8)
 Ber.: C 72,16 H 8,17 N 4,20
 Gef.: C 72,40 H 8,19 N 4,20
 NMR ($CDCl_3/CD_3OD$ als Base) δ 7,66-6,93 (m 18 arom.H);
 5,13 (s 4H, O-CH $\underline{2}$ -); 3,73 (s 2H, N-CH $\leq$); 2,50-0,633
 (m 26H, N-C $\underline{6H_{13}}$)
- 2.51.c 4-Benzyloxybenzylhexylamin-hydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 202°C (Methanol/Äther)
 Ausbeute: 16,0% d.Th. $C_{20}H_{27}NO \times HCl$ (333,9)
 Ber.: C 71,94 H 8,45 N 4,19
 Gef.: C 71,84 H 8,43 N 4,18
 NMR ($CDCl_3$) δ 7,66-6,86 (m 9 arom.H); 4,96 (s 2H
 -O-CH $\underline{2}$ -); 3,96 (s 2H -N-CH $\underline{2}$ -) 3,00-0,66 (m 13H, N-C $\underline{6H_{13}}$)
- 2.52 Reduktion von 4-Benzyloxy-3-chlor-benzylidenbutylamin
 nach Verfahren 1.4./1.6./1.9.*
 Fraktionsfolge: 1) Mesoform, 2) Monomeres, 3) Racemat
- 2.52.a racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-benzyloxy-3'-chlorphenyl)-
 -äthylendiamin-dihydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 100-105°C (Methanol/
 Äther)
 Ausbeute: 8,0% d.Th. $C_{36}H_{42}Cl_2N_2O_2 \times 2HCl$ (678,6)
 *Rohbase nicht destillierbar

Ber.: C 63,72 H 6,53 N 4,12
 Gef.: C 62,95 H 6,55 N 4,10
 NMR (CD_3OD) δ 7,66-6,83 (m 16 arom.H); 5,33 (s 4H, O- CH_2 -); 5,29 (s 2H, N- CH_2 -); 2,93-0,66 (m 18H, C_4H_9)

2.52.b meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-benzyloxy-3'-chlor-phenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 216°C (Äthanol/Äther)
 Ausbeute: 21,0% d.Th. $\text{C}_{36}\text{H}_{42}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2 \times 2\text{HCl}$ (678,6)
 Ber.: C 63,72 H 6,53 N 4,12
 Gef.: C 63,69 H 6,53 N 4,11
 NMR ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 7,90-7,16 (m 16 arom.H); 5,31 (s 4H, O- CH_2 -); 5,13 (s 2H, N- CH_2 -); 2,93-0,66 (18H, N- C_4H_9)

2.52.c 4-Benzyloxy-3-chlorbenzylbutylamin-hydrochlorid
 farblose Kristalle Schmp. = 209°C (Äthanol)
 Ausbeute: 18,5% d.Th. $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{ClNOxHCl}$ (304,8)
 Ber.: C 70,9 H 7,60 N 4,59
 Gef.: C 71,2 H 7,48 N 4,63
 NMR (CD_3ID) δ 7,73-7,13 (m 8 arom.H); 5,23 (s 2H -O- CH_2 -) 4,13 (s 2H -N- CH_2 -) 3,20-0,80 (m 9H, N- C_4H_9)

2.53. racem-N,N'-Dimethyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid
 aus seinem Methyläther nach Verfahren D. 1.12 (5)

2.54 meso-N,N'-Dimethyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid
 aus seinem Methyläther nach Verfahren D. 1.12. (5)

2.55 racem-N,N'-Diäthyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid (5)

2.56 meso-N,N'-Diäthyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin-dihydrochlorid (5)

- 2.57 racem-N,N'-Di-n-propyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid (5)
- 2.58 meso-N,N'-Di-n-propyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid (5)
- 2.59. racem-N,N'-Diisopropyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid (5)
- 2.60. meso-N,N'-Diisopropyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin-dihydrochlorid (5)
- 2.61. racem-N,N'-Dipentyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin nach Verfahren D. 1.14.
farblose Kristalle Schmp. = 104°C (zs) (H₂O)
Ausbeute: 97,0% d.Th. C₂₄H₃₆N₂O₂ (384,6)
Ber.: C 74,96 H 9,44 N 7,28
Gef.: C 74,94 H 9,39 N 7,26
NMR (CD₃OD) δ als Hydrochlorid 7,43-6,85 (m 8 arom.H);
5,33 (s 2H, N-CH₂); 3,33-0,83 (m 22H, N-C₅H₁₁)
- 2.62. meso-N,N'-Dipentyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin nach Verfahren D. 1.14.
farblose Kristalle Schmp. = 147°C (H₂O)
Ausbeute: 94,0% d.Th. C₂₄H₃₆N₂O₂ (384,6)
Ber.: C 74,96 H 9,44 N 7,28
Gef.: C 74,99 H 9,40 N 7,25
NMR (CD₃OD) δ 7,27-6,77 (m 8 arom.H); 3,90 (s 2H,
N-CH₂); 2,60-0,90 (m 22H, N-C₅H₁₁)
- 2.63. racem-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthylendiamin nach Verfahren D. 1.15.
farbloses Kristallpulver Schmp. (Base) = 200°C
Ausbeute: 91,0% d.Th. C₂₆H₄₀N₂O₂ (412,6)

Ber.: C 75,68 H 9,77 N 6,79
 Gef.: C 75,66 H 9,72 N 6,77
 NMR (d_6 DMSO) δ 6,97-6,50 (m 8 arom.H);
 4,83 (s 2H, N-CH $\angle$); 2,80-0,73 (m 26H, N-C $\underline{6H_{13}}$)

2.64 meso-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
 äthylendiamin nach Verfahren D. 1.15.
 farbloses Kristallpulver Schmp. = 220°C (zs) (H $_2$ O)

Ausbeute: 97,0% d.Th. C $_{26}H_{40}N_2O_2$ (412,62)

Ber.: C 75,68 H 9,77 N 6,79
 Gef.: C 75,70 H 9,74 N 6,76
 NMR (d_6 -DMSO) δ 7,40-6,78 (m 8 arom.H);
 4,73 (s 2H, N-CH $\angle$); 2,80-0,67 (m 26H, N-C $\underline{6H_{13}}$)

2.65. trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-
 imidazolidin

grünliches Kristallpulver Schmp. = 96°C (zs)

Ausbeute: 78,0% d.Th. C $_{23}H_{32}N_2O_2$ (368,5)

Ber.: C 74,96 H 8,75 N 7,60
 Gef.: C 74,71 H 8,68 N 7,49
 NMR (CD $_3$ OD) δ 7,40-6,73 (m 8 arom.H);
 4,50 (s 2H, N-CH $_2$ -); 4,23 (s 2H, N-CH $\angle$); 3,20-0,80
 (m 18H, N-C $\underline{4H_9}$)

2.66. meso-1,2-Di-(2'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin
 nach Verfahren D. 1.17.

gelbliche Kristalle Schmp. = 185-186°C (Acetonitril)

Ausbeute: 47,0% d.Th. C $_{14}H_{16}N_2O_2$ (244,3)

2.67. meso-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin
 nach Verfahren D. 1.19.

farblose Kristalle Schmp. = 150°C (Acetonitril)

Ausbeute: 76,0% d.Th. C $_{16}H_{20}N_2O_2$ (272,3)

2.68. meso-N,N'-Di-(4'-methoxybenzyliden)-1,2-
(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin nach Verfahren D. 1.18.
gelbe Kristalle Schmp. = 183°C (Acetonitril)
Ausbeute: 92,0% d.Th. $C_{32}H_{32}N_2O_4$ (508,6)

2.69. racem-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin
nach Verfahren D. 1.20.
farblose Kristallnadeln Schmp. = 114°C (Chloroform/
Äther)
Ausbeute: 90,0% d.Th. $C_{16}H_{20}N_2O_2$ (272,3)

2.70. (-)-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin
nach Verfahren D. 1.21.
farblose Kristallnadeln Schmp. = 89°C (Chloroform/
Äther)
Ausbeute: 87,0% d.Th. $C_{16}H_{20}N_2O_2$ (272,3)
Ber.: C 70,56 H 7,40 N 10,29
Gef.: C 70,72 H 7,36 N 10,39
NMR identisch mit Substanz Nr. D. 2.69.

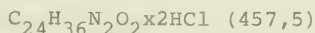
$$[\alpha]_{546}^{25} = -134,5^{\circ} \quad (c = 1,0 \text{ in Methanol})$$

2.71. (+)-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin
nach Verfahren D. 1.21.
farblose Kristallnadeln Schmp. = 90°C (Chloroform/
Äther)
Ausbeute: 88,0% d.Th. $C_{16}H_{20}N_2O_2$ (272,3)
Ber.: C 70,56 H 7,40 N 10,29
Gef.: C 70,70 H 7,52 N 10,31
NMR identisch mit Substanz D. 2.69. und D. 2.70.

$$[\alpha]_{546}^{25} = +138,4^{\circ} \quad (c = 1,0 \text{ in Methanol})$$

2.72. (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylen-
diamin-dihydrochlorid nach Verfahren D. 1.23. aus
Substanz Nr. D. 2.71
farbloses Kristallpulver Schmp. = 234°C (Methanol/Äther)

Ausbeute: 67,0% d.Th. (bezogen auf primäres Äthylen-
diamin)



Ber.: C 63,01 H 8,37 N 6,13

Gef.: C 63,66 H 8,33 N 6,29

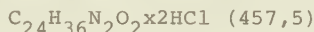
NMR identisch mit der Substanz D. 2.35.a

$$[\alpha]_{546}^{25} = -45,6^\circ \quad (c = 1,0 \text{ in Methanol})$$

- 2.73 (+)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylen-
diamin-dihydrochlorid nach Verfahren D. 1.23.
aus Substanz Nr. D. 2.70.

farbloses Kristallpulver Schmp. = 228-230°C (Methanol/
Äther)

Ausbeute: 71,0% d.Th. (bezogen auf primäres Äthylen-
diamin)



Ber.: C 63,01 H 8,37 N 6,13

Gef.: C 64,08 H 8,48 N 6,11

NMR identisch mit Substanz D 2.35.a und D. 2.72.

$$[\alpha]_{546}^{25} = +46,2^\circ \quad (c = 1,0 \text{ in Methanol})$$

- 2.74. (-)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
äthyldiamin-dihydrochlorid nach Verfahren
D. 1.12. aus Substanz D. 2.72.

hellbraunes Kristallpulver Schmp. = 149-153°C (zs)

Ausbeute: 89,0 d.Th. $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_2 \times 2\text{HCl} \quad (429,4)$

Ber.: C 61,40 H 7,97 N 6,52

Gef.: C 60,29 H 8,18 N 6,28

NMR identisch mit Substanz D. 2.48.a

$$[\alpha]_{546}^{25} = -45,2^\circ \quad (c = 1,0 \text{ in Methanol})$$

- 2.75. (+)-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-
 Äthylendiamin-dihydrochlorid nach Verfahren
 D. 1.12. aus Substanz D. 2.73.
 hellbraunes Kristallpulver Schmp. = 162-168°C (zs)
 Ausbeute: 98,0% d.Th. $C_{22}H_{32}N_2O_2 \cdot 2HCl$ (429,4)
 Ber.: C 61,40 H 7,97 N 6,52
 Gef.: C 62,20 H 8,11 N 6,44
 NMR identisch mit Substanz D. 2.48.a

$$\left[\alpha \right]_{546}^{25} = + 38,2^{\circ} \quad (c = 1,0 \text{ in Methanol})$$

D. 3. Bestimmung der physikalischen Daten

3.1. Verteilungskoeffizienten

10-15 mg Substanz werden zwischen je 10 ml Ober- und Unterphase in einem 30 ml Schüttelröhrchen durch 50 Schüttelvorgänge verteilt. Nach der Phasentrennung läßt man die untere Schicht in ein 2. Schüttelröhrchen ab, gibt 1 ml 3N NaOH und 10 ml H₂O zu und stellt durch 50 Schüttelschläge das Verteilungsgleichgewicht ein. Die abgetrennte und durch ein trockenes Filter gegebene CHCl₃-Schicht wird direkt für die Bestimmung des Basengehalts in der Unterphase verwendet. Die Wasserphase wird verworfen. Die Base in der wäßrigen Oberphase wird in der gleichen Weise in CHCl₃ aufgenommen. Titriert wird mit N/100 p-Toluolsulfonsäure-Chloroformlösung, Indikator p-Dimethylaminoazobenzol.

$$K = \frac{C_{\text{organische Phase}}}{C_{\text{wäßrige Phase}}}$$

3.2. Multiplikative Verteilung der Reaktionsgemische

Für die Verteilungsversuche wurden 100-150 mg des Reduktionsproduktes (als Hydrochloride) in einer Batterie mit 25 Verteilungselementen (nach E. Hecker) verteilt. Es wurden folgende Lösungsmittelsysteme benutzt:

LS I	Chloroform/0,1N Salzsäure	1:1	(V/V)
LS II	Chloroform/0,01N Salzsäure	1:1	(V/V)
LS III	CHCl ₃ /MeOH/0,1N Salzsäure	40/12/28	(V/V)
LS V	CHCl ₃ /MeOH/2% Salzsäure	40/12/28	(V/V)

Der Gehalt der einzelnen Elemente wurde in allen Fällen aminometrisch, wie oben beschrieben, bestimmt. Die G-Werte wurden aus den Kurven nach folgender Gleichung errechnet:

$$G = \frac{y_{n,r}}{y_{n,r-1}} \cdot \frac{r}{n+1-r}$$

in der $y_{n,r}$ die Gewichte der Fraktionen, r die Fraktionsnummer und n die Zahl der insgesamt ausgeführten Verteilungsschritte bedeuten (120d). Die präparative Verteilung wurde in 12 1l Scheidetrichter durchgeführt und die Produkte durch Eindampfen der entsprechenden Fraktionen und Umkristallisation der Rückstand in einer geeigneten Lösungsmittel gewonnen.

3.3. Schmelzpunkte

Bestimmung mit Schmelzpunktapparat nach D. Totolli
 Hersteller W. Büchi, Flawil/Schweiz.
 Sämtliche Werte sind unkorrigiert.

3.4. 1 HNMR-Spektren wurden mit Varian T-60-Spektrometer aufgenommen. Die Zahlenwerte, in δ angegeben, beziehen sich auf Tetramethylsilan als inneren Standort. Es wurden 10%ige Lösungen vermessen.

3.5. CHN-Analysen wurden mit einem CHN-Analyser Modell 185, Modell 185, der Firma Hewlett und Packard durchgeführt.

3.6. Bestimmung der hRF-Werte

Fließmittel (FS)	1: Äthylacetat, Chloroform, Ligroin/Eisessig
	50 : 15 : 20 : 30 (VT)
Fließmittel	2: Benzol/Methanol
	90 : 10
Laufstrecke	: 15 cm
Trägermaterial	: DC-Fertigplatten der Fa. Merck,
	Kieselgel HF ₂₅₄
Detektionsmittel	: Jod/Jod-Kali-Lösung, UV ₂₅₄

3.7. Bestimmung der optischen Drehung

5 cm Küvetten; Lichtelektrisches Polarimeter LEP A 1 (Carl Zeiss)

3.8. Messung der Radioaktivität^{*})

3.8.1. Meßgeräte: Liquid Scintillationssystem LS 133
(Fa. Beckman)

3.8.2. Meßdaten:

Kanal 1 : totale Radioaktivität
Kanal 2 : 50% der totalen Radioaktivität (ohne Quench)
Preset Error: 0,2%
Preset Min. : 10 Minuten pro Kanal
Zählausbeute: 36,6% für Tritium

3.8.3. Szintillatoren^{**})

- a) Toluol-Triton X-100: PPO 5,0 g, DimethylPOPOP 0,3 g, Triton X-100 400 ml, Toluol für Szintillationsmessung (Fa. Merck) 600 ml.
- b) Toluol-Liquifluor^R: 42 ml Liquifluor werden in 1 l Toluol gelöst.

3.8.4. ³H markierte Substanzen

- a) Östradiol 6,7 - ³H (N); spezifische Aktivität 49,3 Ci/mmol. Das Lösungsmittel des Handelspräparates ³H-Östradiol (Benzol/Äthanol 9:1) wird mit N₂ abgedampft und der Rückstand in absolutem Äthanol zu 10⁻⁶ M gelöst. Aus dieser Stammlösung werden mit Trispuffer die Gebrauchslösungen hergestellt. Die Stammlösung wird bei -15°C aufbewahrt (Rezeptortest).
- b) 2,4,6,7-H-3-17ß-Östradiol; spezifische Aktivität: 350-400 mCi/mg; Östradiol-RIA-Kid (Fa. Isotopendienst-West).

^{*}) Alle für die Radioaktivitätsmessung verwendeten Substanzen wurden, falls nichts anderes angegeben, von der Fa. New England Nuclear, Dreieichenhain/Frankfurt, bezogen.

^{**}) PPO = 2,5-Diphenyloxazol; DimethylPOPOP = p-Di-2-(4'-methyl-5'-phenyl-oxazolyl)benzol; Triton X-100 = Isooctyl-phenyloxy-polyäthoxy-äthanol.

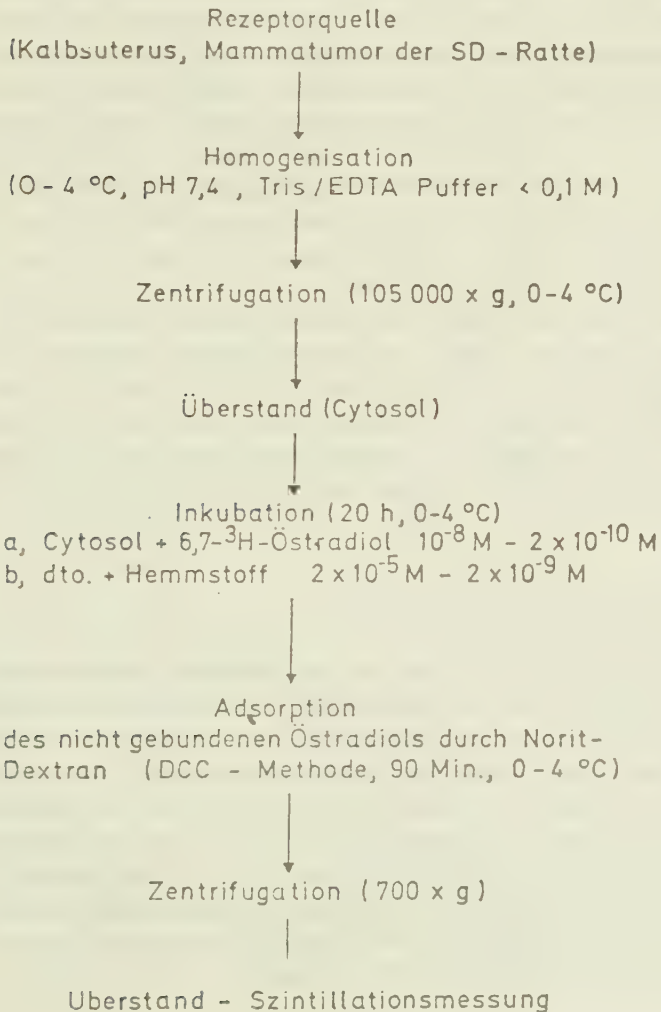
3.9. Bereitung der Substanzen für die Tierversuche

Die Salze der 1,2 Diphenyläthylendiamine wurden in einer 3% PVP-Lösung gelöst. Die saure Lösung wurde unter Rühren mit 0,1 N Natronlauge neutralisiert. Die so hergestellten Feinsuspensionen werden, falls nicht anders angegeben, intraperitoneal verabreicht.

4. Methodik der pharmakologischen Prüfungen

4.1. Methodik der Untersuchungen am Östrogenrezeptor in vitro

4.1.1. Schema des Testverfahrens



4.1.2. Herstellung des Cytosols

Die Östradiolrezeptoren werden aus Kalbsuterus isoliert. Der Uterus stammt aus frisch getöteten Tieren und wird zum Transport in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt. Der Uterus wird bei einer Temperatur von 0-4°C aufgearbeitet. Zuerst werden die Uteri von Fett, Parametrium und Perimetrium befreit und Blut und Schleimreste mit physiologischer Kochsalzlösung abgewaschen. Die beiden Uterushörner werden der Länge nach aufgeschnitten und in drei gleiche Teile geteilt. Jedes der Teile wird mit ca. 1-2 ml Trispuffer (0,01 M Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan / HCl, 0,001 M Äthylendiamintetraessigsäure - EDTA -, 0,003 M Natriumazid, pH 7,5) angefeuchtet, kurz angefroren und in einer Petrischale mit einer Schere grob zerkleinert. Dann wird in einem Glas in Glas Homogenisator (Potter S, Fa. Braun, Melsungen) langsam homogenisiert, wobei die Temperatur 0-4°C nicht überschritten werden soll. Das Homogenat wird 90 Min. bei 0-4°C bei 105 000 x g zentrifugiert (Beckman L-2 Ultrazentrifuge). Das Cytosol wird mit Ausnahme der Fettschicht entnommen und der Proteingehalt nach einer Methode von Lowry (69) bestimmt. Das Cytosol wird mit Tris-Puffer auf einen Proteingehalt von 5-9 mg Protein pro ml eingestellt. Das Cytosol kann ohne nennenswerten Verlust der Bindungsfähigkeit ca. 1 Woche bei 0-4°C aufbewahrt werden.

4.1.3. Kohleadsorptionstechnik (70)

Die Inhibitorkonstanten K_i werden mit Hilfe der Kohleadsorptionstechnik bestimmt. Um eine radiaktive Markierung zu umgehen, arbeitet man mit einer indirekten Methode. Man reduziert die Rezeptor-Wechselbeziehung von ^3H -Östradiol mit der Prüfsubstanz und vergleicht dieses Ergebnis mit den Werten eines inhibitorfreien Kontrollansatzes. Nicht gebundenes ^3H -Östradiol wird mit Aktivkohle entfernt. ^3H -Östradiol-Rezeptor-Komplex zerfällt unter diesen Versuchsbedingungen nicht. Das rezeptorgebundene ^3H -Östradiol wird later Szintillationsmessung bestimmt. Die Kohlesuspension setzt sich wie folgt zusammen:

2% Aktivkohle (Norit A, 4-7 μm)

0,02% Dextran (MG: 60 000 - 90 000)

TRIS/EDTA-Puffer pH 7,5

Die Aktivkohle wird in einer Reibschale langsam mit der Dextran in TRIS-Puffer-Lösung angerieben.

4.1.4. Versuchsaufbau zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_d^+ und K_i^+

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten des Östradiol-Rezeptor-Komplexes und des Hemmstoff-Rezeptor-Komplexes wurden folgende ^3H -Östradiol-Verdünnungen verwendet:

Ausgangsmolarität der ^3H -Östradiol-Verdünnungen

Verd. 1 = $4 \times 10^{-8}\text{M}$ Verd. 4 = $5 \times 10^{-9}\text{M}$

Verd. 2 = $2 \times 10^{-8}\text{M}$ Verd. 5 = $2 \times 10^{-9}\text{M}$

Verd. 3 = $1 \times 10^{-8}\text{M}$ Verd. 6 = $1 \times 10^{-9}\text{M}$

^+K_d = Dissoziationskonstante des Östradiol-Rezeptor-Komplexes

K_i = " " Inhibitor-Rezeptor-Komplexes

Es werden folgende Inkubationsansätze durchgeführt

I) Kontrolle (100% gebunden)

- a) 0,1 ml Cytosol
- b) 0,1 ml TRIS-Puffer pH 7,5
- c) 0,1 ^3H -Östradiol (Verd. 1-6)

II) unspezifische Bindung

- a) 0,1 ml Cytosol
- b) 0,1 ml Östradiol 10^{-4}M (nicht markiert)
- c) 0,1 ml ^3H -Östradiol (Verd. 1-6)

III) Hemmstoff

- a) 0,1 ml Cytosol
- b) 0,1 Hemmstoff (10^{-4} - 10^{-9}M)
- c) 0,1 ^3H -Östradiol (Verd. 1-6)

IV) vorgelegte Aktivität

- a) 0,1 ml ^3H -Östradiol (Verd. 1-6)
- b) 0,2 ml TRIS-EDTA-Puffer pH 7,5

Der Versuch wird entsprechenden Empfehlungen der EORTC-Breast Cancer Cooperative Group durchgeführt (71). Alle Inkubationsansätze werden je 6 mal in der angegebenen Reihenfolge in 1,5 ml Nethelergefäße pipettiert. Nach dem Durchmischen am Whirlmix wird über Nacht bei 0-4°C inkubiert. Nach 20 Std. wird die Inkubation durch Zugabe von 0,2 ml Kohlesuspension gestoppt. Nach dem Durchmischen am Whirlmix wird genau 1,5 Stunden bei 0-4°C stehengelassen und dann die Kohle abzentrifugiert (3000 U/min). 0,1 ml des Überstandes werden in ein Szintillationsmeßglas überführt, mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Anschließend bestimmt man das rezeptorgebundene ^3H -Östradiol im Beckman-Szintillationszähler LS 133.

4.1.5. Berechnung der Dissoziationskonstanten

Die Ergebnisse werden nach Lineweaver-Burk ausgewertet (72). Im Diagramm wird $\frac{1}{G}$ (Ordinate) gegen $\frac{1}{F}$ (Abszisse) aufgetragen, wobei G die molare Konzentration des rezeptorgebundenen ^3H -Östradiols und F die molare Konzentration des freien, nicht gebundenen ^3H -Östradiols ist.

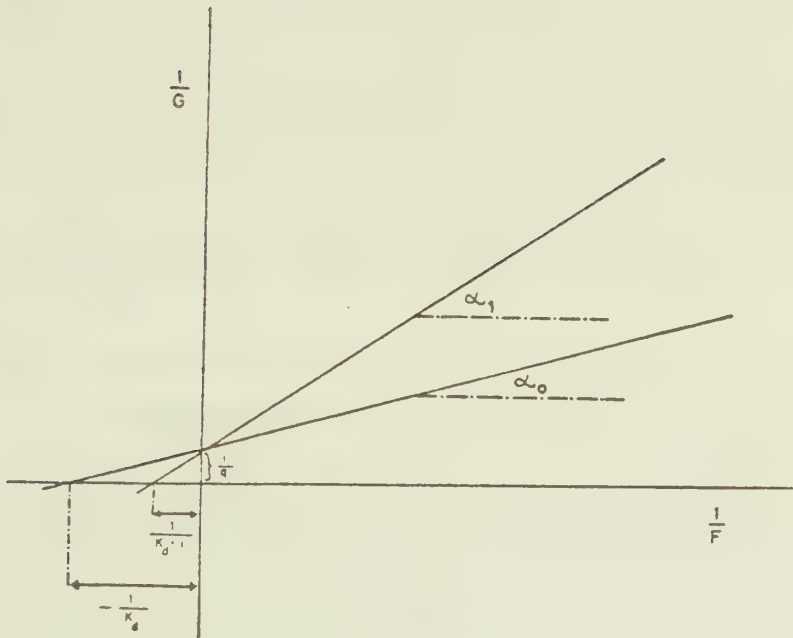
Nach Lineweaver-Burk gilt:

a) bei nicht gehemmter Reaktion:
$$\frac{1}{G} = \frac{K_d}{q} \cdot \frac{1}{F} + \frac{1}{q}$$

b) bei kompetitiver Hemmung:
$$\frac{1}{G} = \frac{K_d \cdot i}{q} \cdot \frac{1}{q}$$

wobei $i = 1 + \frac{f}{K_i}$ sei.

Die Berechnung der molaren Konzentration des rezeptorgebundenen ^3H -Östradiols (G) erfolgt aus den Inkubationsansätzen I und II bzw. III und II bei Verwendung eines Inhibitors. Die Differenzen der Impulse der Inkubationsansätze werden entsprechend der spe-



α_0 : Steigung der Regressionsgeraden der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung

$$(\text{tg } \alpha_0 = \frac{K_d}{q})$$

α_1 : Steigung der Regressionsgeraden der gehemmten Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung

$$(\text{tg } \alpha_1 = \frac{K_d \cdot i}{q})$$

K_d : Dissoziationskonstante des Östradiol-Rezeptor-Komplexes

K_i : Dissoziationskonstante des Inhibitor-Rezeptor-Komplexes

i : Molare Konzentration des Inhibitors

G : Molare Konzentration des rezeptorgebundenen ^3H -Östradiols

F : Molare Konzentration des freien, nicht gebundenen ^3H -Östradiols

q : Konzentration des Rezeptors in Mol gebundenes ^3H -Östradiol pro Proteingehalt des Inkubationsansatzes

$$i: 1 + \frac{i}{K_i}$$

zifischen Aktivität des ^3H -Östradiols und der Zählerausbeute des Szintillationsmeßgerätes in molare Konzentration umgerechnet.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgten mit Hilfe eines programmierbaren Kleincomputer (HP 97 - Fa. Hewlett-Packard). Die Berechnung der Regressionsgeraden der gehemmten bzw. nicht gehemmten Reaktion erfolgte nach Lineweaver-Burk nach der Methode der kleinsten Abweichungsquadrate. Ebenso werden die Dissoziationskonstanten K_d und K_i und der Schnittpunkt der beiden Geraden berechnet.

4.1.6. Bestimmung der Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung (53)

Die Bestimmung der Reversibilität erfolgt mit Cytosolen aus Kalbsuterus entsprechend Abschnitt 4.1.2.

0,2 ml Cytosol werden zur Ausbildung von Rezeptor-Inhibitor-Bindungen mit 0,2 ml 10^{-4} molarer Hemmstofflösung 60 Min. bei 0°C vorinkubiert. In einem Kontrollansatz wird unter gleichen Bedingungen das Cytosol mit 0,2 ml TRIS/EDTA-Puffer inkubiert. Eine Hälfte des Ansatzes wird für 2 Std. bei 0°C mit 0,1 ml einer 5 nM ^3H -Östradiol inkubiert. Nicht gebundenes ^3H -Östradiol wird mit Hilfe der Kohleadsorptionstechnik entfernt und ^3H -Östradiol-Rezeptor-Komplex im Überstand bestimmt. Um nicht rezeptorgebundenen Hemmstoff zu entfernen, wird die andere Hälfte des Ansatzes mit Aktivkohle behandelt und die Überstände mit 0,1 ml 5 nM ^3H -Östradiol versetzt. Man inkubiert zuerst 60 Min. bei 0°C (hot chase-Experiment). Dann bestimmt man wie oben rezeptorgebundenen ^3H -Östradiol. Die Ergebnisse werden graphisch dargestellt. Es sind Mittelwerte aus zwei Versuchen mit je 3 Ansätzen.

4.2. Uterotroper Test (73)

Als Versuchsmaterial dienen weibliche juvenile NMRI-Mäuse (Fa. Wiga, Sulzfeld) mit einem Alter von 20-23 Tagen und einem Gewicht von 8-12g (Wasser und Futter-Standarddiät, Fa. Altromin -

ad libitum).

Die Tiere werden randomisiert und Gruppen zu je 8 Tieren eingeteilt. Jede Substanz wird in 3-6 Dosen in geometrischer Reihenfolge getestet. 1 Kontrollgruppe erhält nur Lösungsmittel, eine Gruppe Östron als Standard-Östrogen. Die Substanz wird an drei aufeinanderfolgenden Tagen zur gleichen Uhrzeit s.c. verabreicht (Nadelgröße Nr. 20). Am vierten Tag werden die Tiere getötet, gewogen, die Uteri entnommen und von anhängenden Gewebeteilen grob befreit. Anschließend werden die Uteri in Bouin-scher^{*}) Lösung 12 Std. fixiert, unter einer Standlupe von restlichem Bindegewebe befreit und mit einer gesättigten alkoholischen Lithiumcarbonatlösung gewaschen. Dann werden die Uteri 24 Stunden bei 100°C im Trockenschrank getrocknet und auf 0,1 mg genau gewogen.

Als Wirkungsparameter gilt:

$$\frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} = x \cdot 100$$

Die statistische Auswertung erfolgt nach Cavalli-Sforza (74). Der Vergleich der maximalen Wirkung von Standard und Testsubstanz erfolgt nach dem F- und T-Test (75).

4.3. Antiuterotroper Test (76)

Der Versuchsaufbau des antiuterotropen Tests ist dem Test auf uterotrope Wirkung im Versuchsaufbau sehr ähnlich. Dabei wird die Fähigkeit einer Substanz geprüft, das durch Östron stimulierte Uteruswachstum juveniler Mäuse zu hemmen.

Es werden Versuche mit folgenden Versuchsgruppen durchgeführt:

1. Gruppe: nur Lösungsmittel s.c. - 0-Wert -
2. Gruppe: Östron 0,32 µg pro Tier s.c. - Standard-Wert
3. Gruppe: Östron 0,32 µg pro Tier s.c. bei gleichzeitiger Gabe von Substanz s.c.

^{*}) Bouinsche Lösung:

5 Teile 40%-iger Formaldehyd; 15 Teile gesättigte, wässrige Pikrinsäurelösung; 1 Teil Eisessig

Die Hemmwirkung der Substanz berechnet sich wie folgt:

$$\% \text{-Hemmung} = 100 \frac{(W_{S,T} - W_o)}{W_S - W_o}$$

$$W: \text{Wirkung} = \frac{\text{Uterustrockengewicht (mg)}}{\text{Körpergewicht (g)}} \times 100$$

W_S : Wirkung Standard

$W_{S,T}$: Wirkung Standard bei gleichzeitiger Gabe von Testsubstanz

W_o : Wirkung Lösungsmittel = 0-Wert

Die Ergebnisse werden nach dem F- und T-Test (75) auf Signifikanz geprüft.

4.4. Kolpotroper Test (Allen-Doisy-Test) (77)

15g-schwere weibliche, ovariectomierte Mäuse erhalten 10 Tage vor Versuchsbeginn eine einmalige 'Priming Dosis' von 0,2 µg Östradiol-benzoat s.c. . Für den Versuch werden nur Tiere verwendet, die darauf mit einem vollen Östrus reagieren. Am ersten, zweiten und dritten Versuchstag erhalten die Tiere (3 Tiere pro Versuchsgruppe, pro Dosis) um 9 Uhr Testsubstanz subcutan gespritzt. Am 3. Versuchstag werden um 15 Uhr, am vierten und fünften Tag um 9 und 15 Uhr jeweils Scheidenabstriche entnommen. Die Entnahme der Abstriche erfolgt mit Hilfe einer 10 µl Eppendorf-Pipette. Es werden jeweils 10 µl 0,9% Natriumchloridlösung in die Scheide gespritzt, gleich darauf wieder entnommen und auf einem Objektträger gebracht. Nach dem Antrocknen der Flüssigkeit wird der Abstrich fixiert, mit Löfflers Methylenblaulösung (Fa. Merck, Darmstadt) 10 Minuten anfärbt und die Abstriche mikroskopisch wie folgt beurteilt:

- o: Leukozyten, Schleim, kleine polygonale kernhaltige Zellen (Diöstrus)
- x: Mischung aus Leukozyten und Epithelzellen (Übergang zwischen Di- und Proöstrus)
- y: kernhaltige bzw. kernhaltige und verhornte Zellen, keine Leukozyten (Proöstrus)

- z: kernhaltige bzw. kernhaltige und verhornte Zellen und bis zu 50% Leukozyten (charakteristisch für Antiöstrogene wie Nafoxidin, Terenius (114))
- l: nur verhornte, kernlose Zellen (Östrus).

4.5. Testung tumorhemmender Verbindungen am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammacarcinom der SD-Ratte.

4.5.1. Tumorinduktion

Am 50., 53. und 56. Lebenstag erhalten weibliche Sprague-Dawley-Ratten eigener Zucht jeweils 2 mg Dimethylbenz(-a-)anthracen (DMBA) in 0,05 ml Dimethylsulfoxid (DMSO). Die Injektion (Nadel Nr. 20) erfolgt langsam intravenös in die hyperämisierte Schwanzvene (78). Die Ausbeuten an behandlungsfähigen, tumortragenden Tieren lag, bezogen auf die überlebenden Tiere, bei 45-50%.

4.5.2. Therapieschema und Datenerfassung

Die Tiere werden ab der 6. Woche nach Induktion 3 mal wöchentlich auf neu auftretende Tumoren abgetastet. Zur Therapie werden nur Tumoren verwendet, die eine Mindestfläche von 140 mm² erreicht haben und in der Zeit vom 50. bis 120. Tag nach Induktion auftreten (79). Die Tumorfläche errechnet sich aus dem Produkt aus kleinstem und größtem Durchmesser (80). Die Messung erfolgt mit Hilfe einer modifizierten Schublehre.

Die behandlungsfähigen Tiere werden in Gruppen zu je 8-10 Tiere eingeteilt und 4 Wochen lang behandelt.

Die Versuchstiere werden 3 mal wöchentlich, Montag, Mittwoch und Freitag gewogen, die Tumoren vermessen und mit Substanz behandelt. Eine Kontrollgruppe erhält nur das Lösungsmittel der Testsubstanz.

Die Tiere werden in klimatisierten Räumen gehalten und erhalten Altromin^R-Standardfutter und Trinkwasser ad libitum.

4.5.3. Auswertung der Versuche

Um die Abhängigkeit der Versuchsdaten von der Ausgangstumorfläche bzw. dem Ausgangstiergewicht zu umgehen, transformiert man die Daten wie folgt:

$$\frac{\text{gemessene Fläche, bzw. Gewicht}}{\text{Ausgangsfläche bzw. -Gewicht}} - 1 \times 100$$

Die Tumorchemmung wurde nach folgenden Kriterien beurteilt:

1. Dem Wachstumsverhalten der Tumoren von Behandlungs- und Kontrollgruppe
 - a) Tumoren, die sich während der Behandlung völlig zurückbilden (VH = völlige Hemmung)
 - b) Tumoren, deren Fläche während des Versuches kleiner wurde oder keine Veränderung zeigte (TH = teilweise Hemmung)
 - c) Tumoren ohne offensichtliche Wachstumshemmung (KH = keine Hemmung)
 - d) Tumoren, die während des Versuches neu auftreten; diese Tumoren werden ebenfalls in die Klasse a-c eingeteilt (NT = neue Tumoren)
2. Dem Quotienten aus dem Quotienten der Tumorflächenänderung der Behandlungsgruppe und der entsprechenden Kontrollgruppe am letzten Versuchstag (T/C).
3. Dem Mittelwert aus prozentualer Tumorflächenänderung aller Tiere einer Versuchsgruppe am Versuchsende gegenüber der Tumorfläche zu Therapiebeginn.

Die Versuche wurden statistisch nach dem U-Test von Wilcoxon, Mann und Whithney (81) ausgewertet. Dabei werden parameterfrei zwei unabhängige Stichproben (Therapie- und Kontrollgruppe) aufgrund ihrer Rangsummen verglichen.

Als Variable wählt man die prozentuale Tumorflächenänderung der einzelnen Tiere am Versuchsende.

4.6. Methodik der radioimmunologischen Bestimmung von Östradiol im Serum

Zur Bestimmung von Östradiol im Serum wird der Östradiol-Reagenziensatz der Fa. Isotopen Dienst West Best. Nr. ESTRKM-Markierung H-3 verwendet.

4.6.2. Vorbereitung der Proben

Probenmenge

Die Probenmenge (Serum) richtet sich nach der zu erwartenden Östradiolkonzentration. In unserem Fall ist eine Probenmenge von 300 µl erforderlich.

Extraktion des Östradiols aus der Probe

In die Glasröhrchen mit den Proben gibt man je 3,5 ml Äther. Man verschließt die Röhrchen mit Polyäthylenstopfen und mischt ca. 1 min. am Vibrationsmixer. Um Ätherverluste zu vermeiden, stellt man die Röhrchen vor dem Öffnen kurz in eine Eis/Kochsalzmischung. Dann wird bei 2000 UpM 5 Minuten zentrifugiert. Ein für Doppelbestimmung ausreichende Menge an Röhrchen wird mit je 1,50 ml des Extraktes beschickt.

2 x 6 Röhrchen für die Eichlösung

Der Inhalt der Röhrchen wird mit Hilfe eines Thermostatbades bei 35 - 40°C bis zur Trockne eingedampft.

4.6.3. Durchführung der Bestimmung

Die Bestimmungen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Röhrchen zur Bestimmung der Proben enthalten den getrockneten Extraktionsrückstand, während die Röhrchen für die Eichkurve den Rückstand von 1,5 ml Lösungsmittel enthalten.

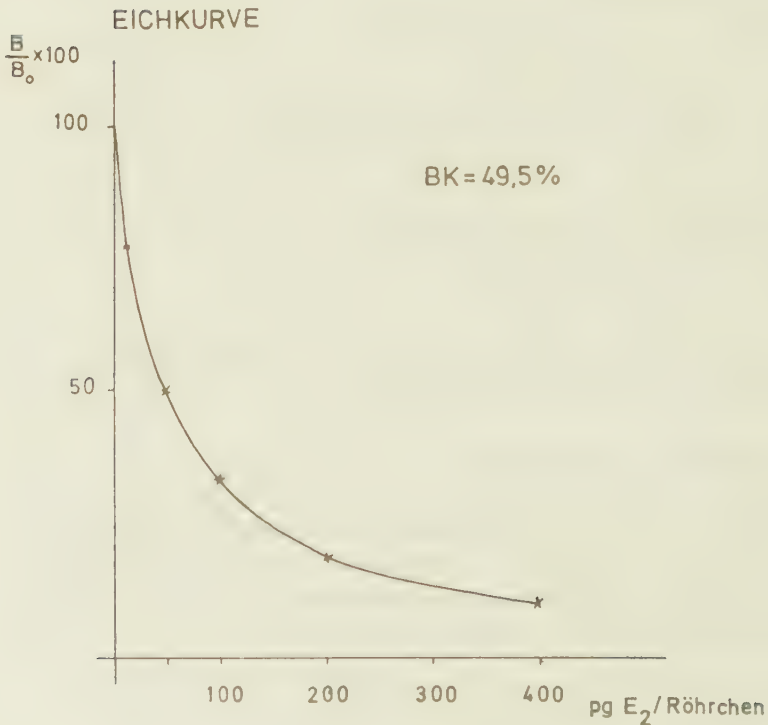
Man arbeitet nach dem folgenden Schema, wobei die Reihenfolge einzuhalten ist. Die im Schema verwendeten Abkürzungen bedeu-

ten:

T = Gesamtaktivität
 0 = Nullpunkt der Eichkurve
 $A_1 - A_6$ = Eichlösungen*)
 S_x = Proben

*) Ausgangsmolarität der Östradiol Eichlösungen

Standard	$A_6 = 4,0 \text{ mg/ml}$	Standard	$A_3 = 0,5 \text{ mg/ml}$
"	$A_5 = 2,0 \text{ mg/ml}$	"	$A_2 = 0,250 \text{ mg/ml}$
"	$A_4 = 1,0 \text{ mg/ml}$	"	$A_1 = 0,125 \text{ mg/ml}$



TESTRÖHRCHEN
(alle Angaben in ml)

A R B E I T S S C H R I T T E

R E A G E N Z I E N	T	0	A ₁ -A ₀	Sx
Pufferlösung	0,90	0,30	0,20	0,30
Eichlösungen	-	-	0,10	-
H-3-Östradiol	0,10	0,10	0,10	0,10
Antiserum	-	0,10	0,10	0,10
nur mischen	x	x	x	x
Dextranaktivkohle-Suspension	-	0,50	0,50	0,50
Zeitspanne f. Zugabe höchstens 4 - 5 Minuten	-	-	-	-
	-	x	x	x
	-	x	x	x
	x	x	x	x
	x	x	x	x

Mischen (Vibr.-Mixer) und 30 Min. bei 37°C inkubieren. Alle Röhrchen in ein Eisbad stellen und 2 Std.* im Kühlschrank bei 2-4°C inkubieren. (Die Temperatur des Kühlschranks ist von Zeit zu Zeit zu überprüfen.)

In die im Eisbad stehenden Röhrchen pipettieren, dabei die Suspension, die ebenfalls in ein Eisbad gestellt wird, mit Magnetrührer rühren

Röhrchen kurz mit dem Vibr.-Mixer durchmischen und in das Eisbad zurücksetzen. Dann genau 10 Minuten warten.

Für 10 Min. bei 1.800 g zentrifugieren (Raumtemp.)

0,50 ml des Überstehenden in Zählröhrchen pipettieren, die 10 ml Szintillationscocktail** enthalten

Messen der Radioaktivität; Zählzeit ca. 5-10 Min.

*) Falls aus arbeitstechnischen Gründen erforderlich, kann die Inkubation bei 40°C auch (z.B. über Nacht) verlängert werden, sollte aber 24 Std. nicht überschreiten.

**) PPO 7 g Naphtalin 100 g
POPOP 0,3 g mit Dioxan auf 1 l auffüllen

4.6.2.4. Berechnung der Ergebnisse

Man errechnet die Netto-Durchschnittszählrate (DZR) für jede Röhrchengruppe.

Dann errechnet man die Bindungskapazität (BK) des Analysensystems als Prozentsatz der Durchschnittszählrate der Röhrchen 0 von der DZR der Röhrchen T:

$$BK \% = \frac{DZR_0 \times 100}{DZR_T}$$

Die Bindungskapazität sollte normalerweise im Bereich von 30 - 50% liegen.

Nun drückt man die Durchschnittszählraten für die Eichlösungen und für die Proben als Prozentsatz der Durchschnittszählrate der Röhrchen 0 aus:

$$\begin{array}{lcl} \text{(B/B}_0\text{) \% Standards} & = & \frac{DZR \times 100}{A_1 - A_6} \\ & & \frac{DZR_{Sx} \times 100}{DZR_0} \end{array} \quad \begin{array}{lcl} \text{(B/B}_0\text{) \% Proben} & = & \frac{DZR_{Sx} \times 100}{DZR_0} \end{array}$$

Man zeichnet die Eichkurve, indem man auf der Ordinate eines Linear/linear-Papiers (B/B₀) % der Eichlösungen und auf der Abszisse die Gehalte der Eichlösungen in pg/Röhrchen aufträgt (siehe Abb.).

Man kann nun den Östradiolgehalt der Proben in pg ablesen.

Je nach dem Volumen der vor der Extraktion eingesetzten Probenmenge und unter Berücksichtigung der Extraktmenge muß man diesen Wert auf 1 ml umrechnen.

4.7. Methodik der radioimmunologischen Bestimmung von Ratten-Prolaktin (r-PRL) im Serum

4.7.1. Vorbereitung der Reagenzien

4.7.1.1. r-PRL-Standardpräparation

Als Standardpräparation wird r-PRL vom National Institute for Artritic, Metabolic and Digestive Disease (NIAMDD), Bethesda, MD U.S.A. verwendet. Diese Präparation wird auch zur Markierung mit ^{125}J eingesetzt.

4.7.1.2. Vorbereitung der r-PRL-Standards

Der lyophilisierte Standard wird in einem Exsiccator auf Zimmertemperatur gebracht, auf einer Feinwaage werden 70 - 150 μg abgewogen und in einem entsprechenden Volumen PBS - gelöst. Entsprechende Anteile der Lösung, die für ein assay ausreichen, werden in flüssigen Stickstoff tiefgefroren und bei -20°C aufbewahrt.

4.7.1.3. r-PRL-Antiserum (1. Antikörper)

Das Antiserum wird von NIMDD geliefert. Zum Gebrauch wird die benötigte Menge Serum mit 0,05M EDTA-PBS pH 7, das Merthiolat 1 : 10 000 enthält, 1 : 400 verdünnt und in Anteilen, die für ein Assay notwendig sind, tiefgefroren.

Alle späteren Verdünnungen werden am Tage des Gebrauches vorgenommen. Verdünnt wird mit NRS, das vorher seinerseits mit 0,05M EDTA-PBS pH 7, 1 : 100 verdünnt wird (Arbeitskonzentration ca. 1 : 2500). Das verdünnte Antiserum kann in Arbeitskonzentration bei -20°C aufbewahrt werden.

4.7.1.4. Radioaktiv markiertes r-PRL

Die Markierung des r-PRL erfolgt mit einer modifizierten Chloramin-T-Methode

Reagenzien zur Radiojodierung

1. ^{125}J (5mCi/50 μl) als Na ^{125}J
2. Chloramin T-Lösung 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS
Vor Gebrauch frisch zubereiten!
3. Na-Metabisulfit-Lösung 2,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in PBS
Vor Gebrauch frisch zubereiten!
4. 5% Rinderalbumin in PBS (v/v)
5. Transfer-Lösung: 100 mg KI, 1,0 mg Bromphenolblau in
10 ml 1,6%iger Saccharoselsg.

4.7.1.4.2. Bereitung der Sephadexsäule

Eine Säule (ca. 20 cm lang, Innendurchmesser ca. 8 mm) wird mit Sephadex G-75 in PBS gefüllt. Man läßt 1,5 ml 5% Rinderalbumin/PBS über die Säule laufen. Anschließend spült man die Säule 10 min. lang mit PBS.

Die Säule ist für die nächsten 24 Stunden gebrauchsfertig. Bei 4° kann sie 14 Tage aufbewahrt werden.

4.7.1.4.3. Markierungsschema

In ein Nethelergefäß werden nacheinander pipettiert:

- 1) 2,5 μg Hormon in 10,0 μl PBS
- 2) 5 μl Na ^{125}J (0,5mCi)
- 3) 25 μl Chloramin T-Lösung (= 50 μg)
Bei Raumtemperatur schütteln. Nach genau 30 Sekunden
- 4) 50 μl Natriummetabisulfit-Lösung
- 5) 50 μl Transfer-Lösung

Das gesamte Reaktionsprodukt wird auf die mit Albumin abgesättigte Sephadex G-75 Säule gegeben. Es wird in 1 ml-Anteilen fraktioniert und in Reagenzgläsern aufgefangen, die je 1 ml 5% Rinderalbumin enthalten. Die Fraktion mit der höchsten Aktivität

wird für das Assay verwendet und auf eine Arbeitskonzentration von ca. 40-60 000 Cpm/ml pro Minute verdünnt.

Eine Nachreinigung des markierten Prolaktins ist nicht erforderlich.

4.7.1.5. Antikaninchenserum vom Schaf (Anti-RGG- 2. Antikörper)

Antikaninchenserum wird durch Immunisierung eines Schafes gegen Kaninchenserum gewonnen. Anti-R66 wird mit PBS auf Arbeitskonzentration verdünnt. Bei -20°C ist die Arbeitsverdünnung unbegrenzt haltbar.

4.7.1.6. Kaninchen-Normalserum (NRS)

Wird auf bekanntem Wege aus Kaninchenblut gewonnen..

4.7.1.7. Sonstige Reagenzien

PBS

143,0 g NaCl, 1,75 g Merthiolat, 100 ml 0,5M NaH_2PO_4 , 260 ml 0,5M Na_2HPO_4 mit dest. Wasser auf 17,5 ltr. verdünnen. pH auf 7,0 einstellen, bei $0-4^{\circ}$ aufbewahren.

0,05M EDTA-PBS, pH 7,0

18,612 g Na_2EDTA , 10,0 ml Merthiolat 1% (g/ml PBS) mit dest. Wasser auf 1000,0 ml auffüllen (pH 7).

4.7.2. Durchführung der Bestimmung

Die Bestimmungen werden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Man arbeitet nach folgendem Schema, wobei die Reihenfolge einzuhalten ist.

4.7.2.1. Pipettierschema

Teströhrchen	Nr.	PBS 5%-BSA	Stan- dard	Proben	Antiser. 1. Antik.	Mark. Hormon	Anti-RGG 2. Antik.	PBS BSA
Background	1	500 µl	-	-	200 µl	100 µl	200 µl	4 ml
	2	"	-	-	NRF		1:?	
	3	"	-	-	1 : 100			
Vorgelegte Aktivität	4	-	-	-				
	5	-	-	-				
	6	-	-	-				
Kontrolle 100% ge- bunden	7	500 µl	-	-				
	12	"	-	-				
Standard	13-15	"	0,5 µl	-				
	16-18	"	1,0 "	-				
	19-21	"	2 "	-				
	22-24	475	4 "	-				
	25-27	470	8 "	-				
	28-30	485	16 "	-				
	31-33	470	32 "	-				
	34-36	440	64 "	-				
Proben Nr. ↓	37-38	470	-	50 µl				
	39-40	440	-	10 µl				
	41-42	470	-	50 µl				
	43-44	470	-	10 µl				
↓								
Schrittfolge		1. 1. Tag	2. 1. Tag	3. 1. Tag	4. 1. Tag	5. 2. Tag	6. 3. Tag	7. 6. Tag

Am sechsten Tag wird bei ca. 3000g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und direkt ohne Scintillationsflüssigkeit gemessen.

4.8. Bestimmung der Prolaktinsenkenden Wirkung von meso- und racem- N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin im Vergleich zu Ergocornin

230 - 270g-schwere Ratten vom Sprague-Dawley-Stamm werden randomisiert, markiert und in Käfigen mit vier Tieren (10 Tiere pro Versuchsgruppe, 1 Tier pro Versuchsgruppe/pro Käfig) unter einheitlichen Bedingungen gehalten (24°C Raumtemperatur, 60 rel. Luftfeuchtigkeit, Trinkwasser und Futter - Altromin^R - ad libitum).

Jedes Tier erhält 18 Std. vor Substanzgabe eine einmalige Injektion von 2 mg Reserpin in wässriger Suspension i.p.. Der Grund für die Reserpingabe ist, den Prolaktinspiegel während des Versuches gleichmäßig zu erhöhen (47). Alle Testsubstanzen werden in 10% Äthanol gelöst und i.p. verabreicht (racem- und meso-ÄDA 80 mg/kg, Ergocornin 50µg/kg). Die Tiere werden bei absoluter Ruhe gehalten und exakt nach 2 Stunden stressfrei dekapitiert und ausgeblutet (zur Vermeidung von stressbedingter Erhöhung des Prolaktinspiegels sollen zwischen erster Irritierung der Tiere und Dekapitation höchstens 1,5 Minuten verstreichen (49, 50, 51). Das Serum wird gesammelt und 150 µl-Anteile zur radioimmunologischen Bestimmung von Prolaktin (siehe Exp. Teil 4.7.) verwendet. Die Ergebnisse werden in Nanogramm NIAMD-prolactin-PR-1 pro Milliliter Serum angegeben.

4.9. Bestimmung der Aktivität von saurer Phosphatase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat Dehydrogenase im Tumorgewebe

4.9.1. Vorbereitung des Gewebes:

Eine Tumorgewebeprobe wird kurz in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, gewogen, in einem Porzellanmörser zerschlagen und mit eiskaltem Trispuffer^{*)} (20% g/ml) homogenisiert. (Elvehjem Glas in Teflon Homogenisator, 10 Stöße bei 5 000 U/min). Das Homogenisat wird 20 min bei 0-2°C mit 15 000 U/min zentrifu-

^{*)} Tris-Puffer: 50 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan

giert (43). Der Überstand wird für die enzymatischen Untersuchungen verwendet.

4.9.1.1. Untersuchung auf Aktivität der sauren Phosphatase (43, 44, 46)

Testkombination Boehringer, Mannheim

Wellenlänge: 405 nm

Glasküvette: 1cm Schichtdicke

Meßtemperatur: 37°C

Messung gegen Leerwert

Abweichend zur Vorschrift nach Boehringer Mannheim, wird die Substratlösung in 8ml frisch dest. Wasser bereitet.

Das Cytosol wird vor Zugabe des Substrates 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert, um mikrosomale Phosphatase zu inaktivieren (45).

In Reagenzgläser pipettieren:

	Leerwert	Probe
Puffer	0,2 ml	0,2 ml
Cytosol	-	0,2 ml

mischen, genau 10 Min. bei 37°C im Wasserbad stehen lassen

Substrat	0,8 ml	0,8 ml
----------	--------	--------

mischen, genau 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad stehen lassen

Natronlauge	10,0 ml	10,0 ml
Cytosol	0,2 ml	-

mischen, in Küvetten gießen, Extinktion der Probe gegen Leerwert messen.

Lösungen:

Puffer: 50 mM Citratpuffer, pH = 4,8

Substrat: 50 mM Citratpuffer, 6,9 mM Natrium-p-nitrophenyl-
phosphat

Natronlauge: 0,02 N

Berechnung:

$$\text{Volumenaktivität:} = 101 \cdot \Delta E \quad [\text{mU/ml}]$$

4.9.1.2. Bestimmung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase

Bei der Bestimmung von Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase wird die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase miterfaßt (43). Das beim Reaktionsschritt $\text{Glucose-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightleftharpoons{\text{G-6-P-DH}} \text{Gluconat-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$ entstehende 6-Phosphogluconat dient dabei als Substrat.

Bestimmungsansatz:

Wellenlänge: 366 nm
Glasküvetten: 1cm Schichtdicke
Temperatur: 25°C
Messungen gegen Luft

In Reagenzgläser pipettieren:

	Probe
Puffer	2,00 ml
NADP	0,10 ml
Cytosol	1,00 ml
mischen, ca. 5 min. bei 25° im Wasserbad stehen lassen	
Substrat	0,05 ml

mischen, in Küvetten gießen, Extinktion ablesen und gleichzeitig Stoppuhr starten. Nach genau 1,2 und 3 min. Ablesung wiederholen, $\Delta E/\text{min}$ - Mittelwert bilden.

Lösungen:

Puffer: 50 mM Triäthanolaminpuffer, pH = 7,6 5 mM ÄDTA
NADP: 10 mM
Substrat: Glucose-6-Phosphat, 31 mM

Berechnung: (Gesamtaktivität)

$$\text{Volumenaktivität} = 955 \cdot \Delta E_{(366\text{nm})}/\text{min} \quad [\text{mU/ml}]$$

E. Zusammenfassung

Ausgehend von N,N'-Dimethyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylen-diamin (N-isosteres Hexöstrol) wurde eine systematische Struktur-Wirkungsstudie zur Entwicklung mammatumورهemmender Verbindungen durchgeführt. Variiert wurde die Konfiguration, die N-Alkylkette und die Stellung der ringständigen OH- und Cl-Substituenten.

Die Synthese erfolgte durch Reduktion von N-Alkyl-benzyliden-aminen mit aktiviertem Aluminium oder Benzpinakol. Die anfallenden Diastereomerengemische wurden durch präparative Craig-Verteilung oder fraktionierte Kristallisation getrennt. Die Herstellung der optisch aktiven Komponenten des wirksamsten Diastereomer, racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylen-diamin (Nr. 2.48a) gelang durch Antipodentrennung von racem-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin mit optisch aktiver Weinsäure, Acylierung mit Buttersäurechlorid, Reduktion mit LiAlH_4 und anschließender Ätherspaltung. Racem-1,2-Di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin wurde durch entartete Diazo-Cope-Umlagerung von N,N'-Di-(4'-methoxybenzyliden)-meso-1,2-di-(4'-methoxyphenyl)-äthylendiamin erhalten.

Die biologische Bewertung der homologen N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine und der stellungsisomeren N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-chlor-hydroxyphenyl)-äthylendiamine wurde mit folgenden 8 Testverfahren vorgenommen:

- 1) Hemmung der Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung in vitro
- 2) Bestimmung der Reversibilität der Inhibitor-Rezeptor-Bindung in vitro
- 3) Prüfung auf kolpotrope und uterotrope Wirkung in vivo
- 4) Prüfung auf antiuterotrope Wirkung in vivo
- 5) Prüfung am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammatumor der SD-Ratte
- 6) Bestimmung der cytociden Wirkung am Walker-256-Carcinosarkom in vitro
- 7) Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinbiosynthese am Walker-256-Carcinosarkom in vitro

8) Beeinflussung des Serumprolaktinspiegels der Ratte.

Die Untersuchungen ergaben folgende Ergebnisse:

In der Klasse der N,N'-Dialkyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamine zeigten ausschließlich die Racemate eine Affinität zum Östradiolrezeptor. Die Mesoformen waren unwirksam. Die Verlagerung der OH-Gruppe in die 3- bzw. 2-Stellung führte zu einem weitgehenden Verlust der Rezeptoraffinität. Die größte Affinität zum Rezeptor zeigte das Butyl-Derivat, kürzer- oder längerkettige Verbindungen waren weniger wirksam. Durch zusätzliche Einführung von Chlor war eine weitere Steigerung der Rezeptoraffinität möglich. Die Trennung des affinsten Vertreters racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Subst. Nr. 2.48a) in seine optischen Antipoden brachte eine Affinitätssteigerung um 1 Zehnerpotenz bei (+)-Enantiomerem (Subst. Nr. 2.75).

Alle affinen Verbindungen hemmen die Östradiol-Rezeptor-Wechselbeziehung kompetitiv.

Die Inhibitor-Rezeptor-Bindung ist in allen Fällen im "hot-chase-Experiment" reversibel.

Im Test auf uterotrope und antiuterotrope Wirkung konnten weder Östrogene noch antiöstrogene Effekte nachgewiesen werden.

Am DMBA-induzierten hormonabhängigen Mammatumor der Ratte zeigten die geprüften rezeptoraffinen Verbindungen (+)-, (-)- und racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Subst. Nr. 2.75, 2.74, 2.48a), racem-N,N'-Dihexyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Subst. Nr. 2.63) und trans-1,3-Dibutyl-4,5-di-(4'-hydroxyphenyl)-imidazolidin (Subst.Nr. 2.65), eine ausgeprägte, annähernd gleich starke Antitumor-Wirkung (T/C 0,33-o,38). Meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Subst.Nr. 2.48), stimuliert das Tumorstadium.

Keine der geprüften Verbindungen zeigt am Walker-256-Carcinosarkom in vitro eine cytocide oder DNA-, RNA- bzw. Proteinbiosynthese-hemmende Wirkung.

Verbindung Nr. 2.48a senkt den Serumprolaktinspiegel (nicht signifikant).

Meso-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Subst. Nr. 2.48b) erhöht ihn.

Neben einer Hemmung des tumorwachstumstimulierenden Effekts endogener Östrogene wird für racem-N,N'-Dibutyl-1,2-di-(4'-hydroxyphenyl)-äthylendiamin (Subst. Nr. 2.48a) eine Senkung des Prolaktinspiegels als Ursache der mammatumورهemmenden Wirkung diskutiert.

Literaturverzeichnis

- 1) Mintz, M.J. und C. Wallig, Org.Synth. 49, 9 (1969)
- 2) Teeter, H.M. und E.W. Boll, Organic. Synth. IV, 125 (1969)
- 3) Ginsburg, D., J.Am.Chem.Soc. 73, 702 (1951)
- 4) Anbar, M. und D. Ginsburg, Chem.Rev. 54, 925 (1954)
- 5) Bernhauer, H., Dissertation München 1965
- 6) Taneja, A.K., Dissertation München 1975
- 7) Reimann, E., Chem.Ber. 102, 2881-2888 (1969)
- 8) Schönenberger, R. und C. Sunkel, Arzneimittelforsch. 22,
1952-1955 (1972)
- 9) Vögtle, F. und E. Goldschmitt, Chem.Ber. 109, 1-40 (1976)
- 10) Japp, F.R. und S.C. Hooker, Ber.Deut.Chem.Ges. 17, 2402
(1884)
- 11) Dietzel, R. und W. Paul, Arch.Pharm. 273, 507 (1935)
- 12) Hecker, E., Chemie-Ing.-Techn. 25, 505 (1953)
- 13) Stühmer, W., G.Messwarb, Arch.Pharmaz. 286, 221 (1953)
- 14) Anselmino, O., Ber.Dtsch.Chem.Ges. 41, 623 (1908)
- 15) Padwa, A., W. Bergmark, D. Pashayan, J.Amer.Chem.Soc. 91,
2260 (1969)
- 16) Schönenberger, H. et al., Arch.Pharmaz. 298, 367 (1965)
- 17) Schönenberger, H. et al., Arch.Pharmaz. 300, 258 (1967)
- 18) Schönenberger, H. et al., Arch.Pharmaz. 300, 268 (1967)
- 19) Schönenberger, H. et al., Arch.Pharmaz. 300, 483 (1967)
- 20) Hoffmann, E., Dissertation München 1974
- 21) Schönenberger, H., Habilitationsschrift München 1959
- 22) Stern, R., J. Englisch, H. Cassidy, J.Amer.Chem.Soc. 79,
5798 (1957)
- 23) Schönenberger, H., Chem.Ber. 91, 862 (1958)
- 24) Schönenberger, H., R. Brinkmann, E. Bamann, Arch.Pharm.
297, 51 (1964)
- 25) Schönenberger, H., unveröffentlicht
- 26) Higuchi, T., A. Michaelis, T. Tan, A. Hurwitz, Anal.Chem.
39, 974 (1967)
- 27) Higuchi, T., K. Kato, J.Pharm.Sci. 55, 1080 (1966)
- 28) Pfanz, H., G. Kirchner, Liebigs Ann.Chem. 614, 149 (1958)
- 29) Liefschitz, G. und J.G. Bos, Rec.Trav.Chim. 59, 173-83 (1940)

- 30) Goldschmitt, E. und F. Vögtle, Chem.Exp.Didakt. 0, 17 (1974)
- 31) Vögtle, F. und E. Goldschmitt, Angew.Chem. 85, 824 (1973)
- 32) Feist, F. und H. Arnstein, Ber.Deut.Chem.Ges. 27, 213
(1894)
- 33) Armand, J., Ph. Bassinet et al., C.R.Acad.Sci.Sér. C 277,
695 (1973)
- 34) Fischer, O. und G. Prause, J.Prakt.Chem. 2 77, 125 (1910)
- 35) Hunter, D.H. und S.K.Sim, J.Am.Chem.Soc. 91, 6202 (1969)
- 36) Masayoshi Ishibashi, Mem.Coll.Sci. Kyoto Imp. Univ. A 8
(1925)
- 37) Japp, T. und J. Moir, J.Chem.Soc. 77, 638 (1900)
- 38) Winans, C.F. und H. Adkins, J.Am.Chem.Soc. 55, 2051 (1933)
- 39) Vögtle, F. und E. Goldschmitt, Angew.Chem. 86, 520 (1974)
- 40) Meric, R. und J.P. Vigneron, Tetr.Lett. 24, 2059 (1974)
- 41) Staab, H. und F. Vögtle, Chem.Ber. 98, 2681 (1965)
- 42) Bothroyd, B., B. und E.R. Clark, J.Chem.Soc. 1499 (1953)
- 43) Bergmeyer, H.U., Methoden der enzymatischen Analyse,
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 3.Aufl. Bd. I, S. 674-678
(1974), S. 88-892 (1974)
- 44) Nicholson, R.I. und I. Bagnall, Europ.J.Cancer 9, 313-318
(1973)
- 45) Neil, N.W. und M.W. Horner, Biochem.J. 92, 217 (1964)
- 46) Nicholson, R.I. und M.P. Golder, Eur.J.Cancer 11, 571-79
(1975)
- 47) Cassedy, J.M., G.S. Li, E.B. Spitzer et al., J.Med.Chem.
17, 300 (1974)
- 48) Lie et al., J.Med.Chem. 18, 892 (1975)
- 49) Fenske, M. und W. Wuttke, Brain Research 104, 63-70 (1976)
- 50) Ytschak-Koch, Y.F. Chow et al., Endocrinology 89, 1303
(1971)
- 51) Wuttke, W., persönliche Mitteilung (1977)
- 52) Terenius, R., Acta endocrinol. 64, 47 (1970)
- 53) Rochefort, H. und F. Capony, FEBS Letters 20, 11 (1972)
- 54) Schönenberger, H., G. Griebel und D. Adam, Arzneimittelforsch. 21, 2104-2106 (1971)
- 55) Dietrich, L.J., Cancer Research 21, 502 (1961)
- 56) Schmähel, D., Maligne Tumoren, Editio Cantor (Aulendorf)
(1970) s. 358

- 57) Meites, J., J.Nat.Cancer Inst. 48, 1217-1224 (1972)
- 58) Noble, R.L. und J.B. Collip, Canad.Med.Assoc.J., 44, 1-5
(1941)
- 59) Huggins, C., Cancer Res. 25, 1163-1167 (1965)
- 60) Pearson, D.H., O.Llerena et al., Trans.Assoc.Physicians
82, 225-238 (1969)
- 61) Talwalker, P.K., J. Meites und H. Mizuno, Proc.Soc.Exp.Biol.
Med. 116, 531-534 (1964)
- 62) Li, C.H. und J. Meites, Meth.Invest.Diagnost.Endocrinology
24 (Pept.Horm.), 559-569 (1973)
- 63) Sterental, A., J.M. Dominguez et al., Cancer Res. 23,
481-484 (1963)
- 64) Clemens, J.A. und C.W. Welsch, Proc.Soc.Exp.Biol.Med.
127, 969-972 (1968)
- 65) Welsch, C.W., J.A. Clemens und J. Meites, Cancer Res.
29, 1541-1549 (1969)
- 66) Heuson, I.C. et al., Gynecol.Invest. 2, (1-6), 130)
(1971 - 1972)
- 67) Meites, J., Hypophysiotropic Hormons of the Hypothalamus:
Assay and Chemistry, Baltimore, Williams and Wilkins
Co. 1970, pp 261-281
- 68) Geynet, C., C. Millet et al., Gynec.Invest. 3, 2 (1972)
- 69) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough et al., J.Biol.Chem. 193,
265 (1951)
- 70) Korenman, S.G., J.Clin.Endocrinol.Metab. 28, 127 (1968)
- 71) EORTC Breast Cancer Cooperative Group, Eur.J.Cancer 9, 379
(1973)
- 72) Lineweaver, H. und D. Burk, J.Am.Chem.Soc. 56, 658 (1973)
- 73) Rubin, B.L., A.S. Dorfman et al., Endocrinology 49, 429
(1951)
- 74) Cavalli-Sforza, L., Biometrie, 6.Fischer Verlag Stuttgart
123 (1972)
- 75) Cavalli-Sforza, L., Biometrie, 6.Fischer Verlag Stuttgart
153 (1972)
- 76) Edgren, R.A. und D.W. Calhoun, Proc.Soc.Exp.Biol. and Med.
537 (1957)
- 77) Terenius, L., Steroids 17, 653 (1971)

- 78) Somogy, A. und K. Kovacs, *Cancer Res.* 30, 1958 (1970)
- 79) Teller, M.N. et al., *Cancer Res.* 26, 245 (1966)
- 80) Mückter, H. und E. Moré, *Arzneimittel-Forsch.* 16, 129 (1966)
- 81) Sachs, L., *Statistische Auswertungsmethoden*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1.Auflage (1968)
- 82) Seidl, G., *Dtsch.Apoth.Zeitung* 118/4, 131-136 (1978)
- 83) Beckett, A.H., in E.Jucker (Herausgeber), *Fortschritte der Arzneimittelforschung*, Bd. 1, 499 (1966)
- 84) Schaumann, O., *Arzneimittel-Forsch.* 4, 115 (1954)
- 85) Knabe, J., H.P. Büch et al., *Arch.Pharm.* 308, 313-315 (1975)
- 86) Knabe, J., H.P. Büch et al., *Arch.Pharm.* 309, 681-685 (1976)
- 87) Meites, J., *Prolactin 4. Regulation of Secretion Hypothalamic Control, Methods Invest.Diagn.Endocrinol.* 1973, 2 A (Pept.Horm.) p.p. 609-615
- 88) Hökfelt, T. und K.Fuxe, *Neuroendocrinology* 9, 100 (1972)
- 89) MacLeod, R.M., *Endocrinology* 85, 916 (1969)
- 90) Birge, C.A. et al., *Endocrinology* 86, 120 (1970)
- 91) Lu, K.H. et al., *Endocrinology* 87, 667 (1970)
- 92) Lu, K.H. und J. Meites, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 137, 480 (1971)
- 93) Floss, H.G., J.M. Cassedy und J.E. Robbers, *J. of Pharmaceutical Sciences* 62/ 5, 699-715 (1973)
- 94) Ratner, A., P.K. Talwalker und J. Meites, *Endocrinology* 77, 315 (1965)
- 95) Triggle, D.J., *Neurotransmitter-Receptor-Interactions*, Academic Press, London, New York 1971
- 96) Pearson, O., O. Llerena et al., *Trans Assoc.Am.Physicians* Ixxxii, 225 (1969)
- 97) Hüttenrauch, R., *Pharmazie* 28/2, 84-102 (1973)
- 98) Kranzfelder, G., *Dissertation München* 1977
- 99) Jensen, E.V., P.J. Brecher et al., *Estrogen Interactions with Target Tissues*, in O'Malley and Hardman (Eds.): *Methods in Enzymology*, Vol. 36A, Academic Press (New York, San Francisco-London), 267 (1975)
- 100) Stransky, D.E., *Dissertation München* 1975
- 101) Schueler, F.W., *Science* 103, 221 (1946)
- 102) Watson, J.D., *Molecular Biology of the Gene*, Benjamin (NY) (1969)

- 103) Gill, E.W., Drug Receptor Interactions, in Ellis a. West (Eds.) Progress in Medicinal Chemistry 4; Butterworths (London), 51 (1965)
- 104) Schmitt-Wallenborn, H., Diss. München in Vorbereitung
- 105) Terenius L., Acta endocrinol. 64, 431 (1971)
- 106) Meites, J. und J.T. Sgouris, Endocrinology 53, 17-23 (1953)
- 107) Meites, J., E. Cassell und J. Clark, Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 137, 1225-1227 (1971)
- 108) Meites, J. und C.S. Nicoll, Adenohypophysis prolactin, Ann.Rev.Physiol. 28, 57 (1966)
- 109) Metzler, M., J. of Toxicology and Environmental Health, 1, 21-35 (1976)
- 110) Brandt, W., Dissertation München 1969
- 111) Scholtan, W., Arzneimittel-Forsch. 18, 505 (1968)
- 112) Schönenberger, H. et al., Pharmazie 31, 9 590 (1976)
- 113) Katzenellenbogen, B. und J.H. Katzenellenbogen, Biochem. Biophys.Res.Comm. 50 (4), 1152 (1973)
- 114) Clark, J.H., J.N. Anderson, Steroids 22 (5), 707 (1973)

Lebenslauf

Name:	<u>Egginger</u> Günter F.
geboren am:	28. November 1946
Geburtsort:	Regensburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Schulbildung:	1953-1957 Volksschule Regensburg 1957-1967 Goethe-Gymnasium Regensb.
Reifeprüfung:	1967 - Regensburg
Berufsausbildung	
Praktikantenzeit:	1967-1969 St. Thomas-Apotheke in Roding/Opf.
Pharmazeutisches Vorexamen:	1969 in Regensburg
Studium der Pharmazie:	WS 1969/70 - SS 1972 - Universität München
Staatsexamen:	1972 in München
Approbation:	1973
Wissenschaftliche Arbeit:	November 1972 bis Oktober 1977 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Schönenberger, Institut für Pharmazie und Lebensmittel- chemie der Universität München.
Berufliche Tätigkeit:	seit 1974 Verwalter einer wiss. Assistentenstelle

